

國立交通大學

資訊科學與工程研究所

碩 士 論 文

利用視訊主動偵測果蠅睡眠系統之研發



The research on the automatic detection system by using the video-information for
fruit fly sleeping

研 究 生：林聖喬

指導教授：荊宇泰 教授

中 華 民 國 九 十 七 年 十 二 月

利用視訊主動偵測果蠅睡眠系統之研發

The research on the automatic detection system by using the
video-information for fruit fly sleeping

研究生：林聖喬

Student：Sheng-Chiao Lin

指導教授：荊宇泰

Advisor：Yu-Tai Ching

國立交通大學

資訊科學與工程研究所



Submitted to Institute of Computer Science and Engineering
College of Computer Science
National Chiao Tung University
in partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master
in

Computer Science

December 2008

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十七年十二月

利用視訊主動偵測果蠅睡眠系統之研發

學生:林聖喬

指導教授:荊宇泰 博士

國立交通大學資訊科學與工程研究所

摘 要



一般研究果蠅睡眠行為實驗皆為利用紅外線偵測果蠅移動次數，必須要果蠅移動到特定地點才會偵測到屬於被動偵測模式，所以可能會忽略一些細部資料以及無法偵測區域。本論文實驗提供另一種主動偵測實驗法來解決被動偵測所產生的問題，能提供更完整的果蠅睡眠行為資料，也提供果蠅活動行為資料等等。

The research on the automatic detection system by using the video-information for fruit fly sleeping

Student: Sheng-Chiao Lin

Advisor: Dr. Yu-Tai Ching

Institute of Computer Science and Engineering
National Chiao Tung University

ABSTRACT



The experiment of *Drosophila*'s sleeping behavior is generally carried out by detecting movements of the *Drosophila* using the infrared at a specific point. For those cases if a *Drosophila* is moving but does not passing through the place where infrared emits, we could underestimate the number of movements of the fly. In this thesis, we study the possibility of using the video signal to detect the movements of the fly. Our experiments show that our system can replace the conventional system.

目錄

第一章 序論	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 研究動機.....	2
1.3 研究方法.....	3
1.4 論文架構.....	4
第二章 相關研究	5
2.1 前言.....	5
2.2 實驗過程.....	6
第三章 實驗流程	8
3.1 實驗簡介.....	8
3.2 果蠅合法區域偵測.....	10
3.3 果蠅主動偵測硬體架構.....	14
3.3 影像相減(Image Subtraction)及影像處理	18
3.4 去除雜訊(Denoise)及輸出結果至檔案.....	20
3.5 模擬 Behavioral Analysis 實驗	24
3.6 實驗流程.....	25
第四章 統計分析及實驗結果	27
4.1 操作介面使用.....	27
4.2 資料轉換及統計分析.....	29
4.3 實驗結果、統計資料及結論.....	31
果蠅編號 1	41
第五章 結論與未來展望	46
參考文獻	47
附錄	48

第一章 序論

1.1 研究背景

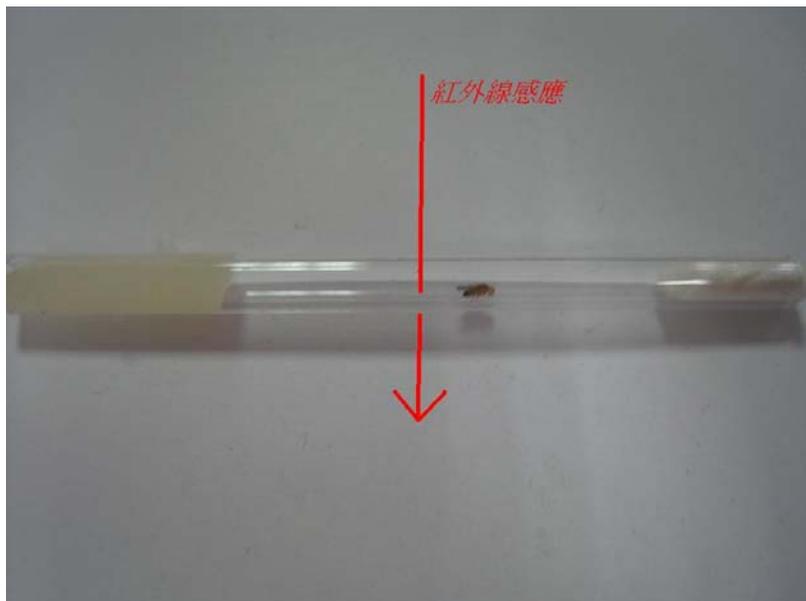
睡眠對人類是一件很重要的事情，因為睡眠會影響人類很多行為如影響發育、健康、情緒、睡的充足時記憶力會提高、睡眠不足時會令人脾氣容易暴躁，而睡眠長短會隨著年紀增長而有所不同等等。

為了想了解睡眠行為例如睡眠長短、熟睡淺睡等是否由基因來控制，所以設計實驗來觀察其睡眠行為。為了了解睡眠行為是否由基因所控制影響，這裡常用的方法是用統計學來研究基因改善前跟改善後的資料，是否影響睡眠長短、入睡時間、睡眠次數、等等很多睡眠相關行為統計數據來觀察。一般果蠅睡眠實驗所取得的研究數據為被動實驗數據，是利用改善基因後的果蠅(實驗組)和正常果蠅(對照組)的實驗統計數據來計算研究。

因為不知道睡眠實驗後會對人體有什麼影響，而怕對人體產生危險或潛在的傷害，加上實驗不易且時間過於長久，以及取得大量資料不易，所以先選用小動物來做實驗，例如果蠅、白老鼠等等之類。其中因為果蠅生殖快，繁殖容易，基因與人類相似，最重要是果蠅跟人類一樣都有每天固定時間睡覺等等相同的睡眠行為，所以這類實驗以果蠅(*Drosophila*)為主要對象來觀察研究。

1.2 研究動機

一般睡眠資料的取得都是被動偵測[1]所取得，如下圖[1-1]，也就是把果蠅放在一根標準 2mm*60mm 的實驗管子(**standard locomotor assay tubes**)裡，利用紅外線穿過管子正中間來感應，當果蠅穿過紅外線時感應計數器自動加一，記錄每分鐘所經過次數[2]。果蠅睡眠狀態的定義為連續 5 分鐘經過次數為 0 時，就認定為果蠅睡眠。這實驗的主要缺點是果蠅要經過紅外線才會感應到，而忽略小部份活動都在管子的一側，因而沒感應到紅外線，被誤認為睡眠狀態的可能，而把其錯誤資料加入統計數據，進而對研究數據產生些許誤差，而這實驗所取得的資料也無法判斷果蠅活動的時間，只能觀察其睡眠行為，而無法用果蠅活動時間資料來做對比比較。所以本論文實驗是要以新的方式主動偵測來取得果蠅睡眠資料來解決上述的缺點，使果蠅睡眠行為實驗及統計資料更準確，用方便研究觀察。



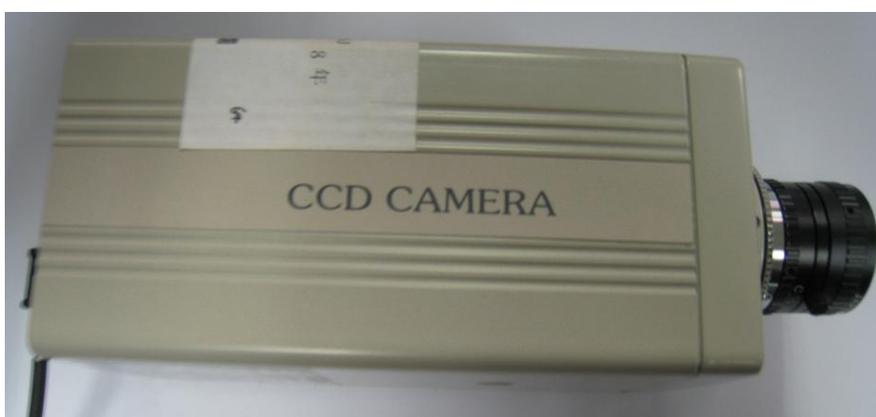
圖[1-1]被動偵測法圖示

1.3 研究方法

新的果蠅觀測方法為主動偵測，如下圖[1-2][1-3]，也就是架設一組 CCD CAMERA 跟影像擷取卡來連續攝影果蠅睡眠狀況等，而透過影像擷取卡連續擷取出果蠅活動影像，被擷取出的影像經過處理後來做分析果蠅睡眠狀況，進而取得果蠅睡眠或活動資料，記錄成為統計資料，最後分析新的影像資料來統計睡眠時間。



圖[1-2] ADLINK 影像擷取卡



圖[1-3] CHIPER(巨普)星光級數位式高解析黑白攝影機

1.4 論文架構

本篇論文分為五個章節:第一章為序論介紹研究背景、動機、實驗方法等，第二章為簡略介紹果蠅，以及 Behavioral Analysis 實驗方法等等，第三章介紹實驗方法、實驗器材、流程及研究心得、以及用影像方法模擬 Behavioral Analysis 實驗，第四章是設計實驗統計資料數據程式及本論文實驗結果、圖示等，第五章為結論以及未來展望，附錄為果蠅成長史及飼養方法等等。



第二章 相關研究

2.1 前言

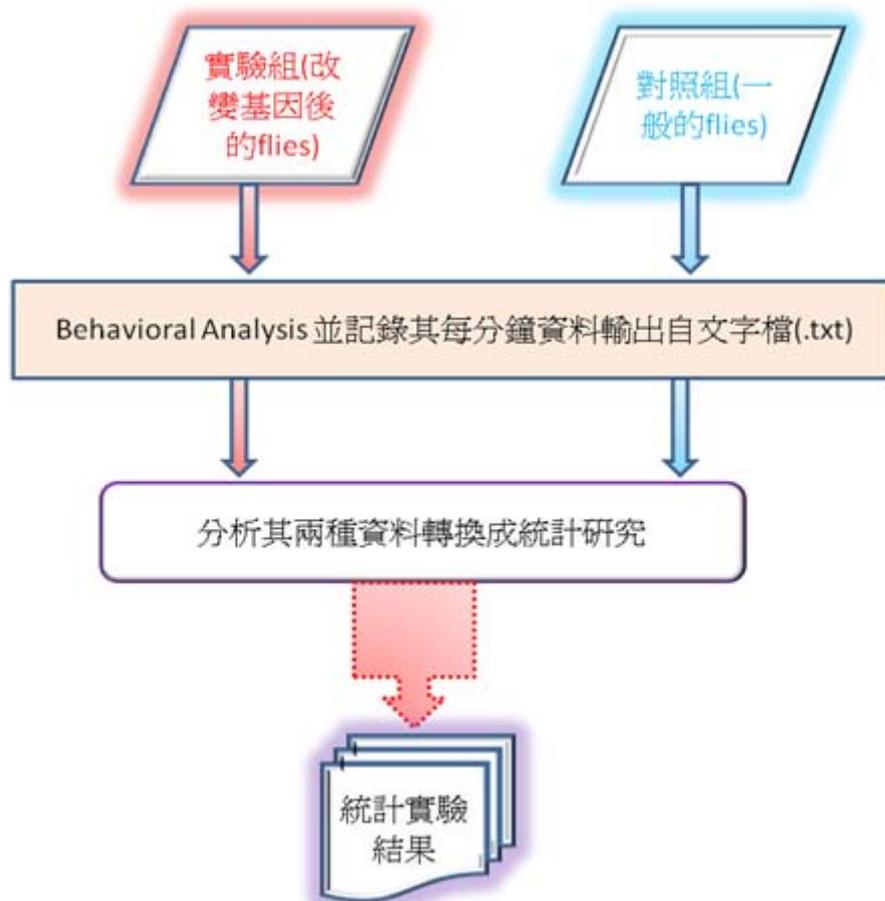
果蠅(*Drosophila* or fruit fly)繁殖力強，生命週期短，能繁殖大量的後代，繁殖飼養成本低，所以非常適合當作試驗生物，以下為果蠅的簡介。

果蠅英文俗名為 fruit fly 或 vinegar fly，是雙翅目 Tephritidae(大果蠅)科和 Drosophilidae(小果蠅或醋蠅)科的昆蟲，全世界發現的物種超過 1000 種，本研究主要研究對象為黑腹果蠅，只有 4 對染色體(一對 X 和 Y 的性染色體以及第二、第三、第四對染色體)，其 14 天就能繁殖一代，果蠅在攝氏 25 度下，所以方便研究觀察。果蠅廣泛分布在溫帶及熱帶區域，主要食物為腐爛的水果或植物等中的微生物，如酵母和細菌。其雌性體長 2.5 毫米，雄性有深色後肢體型較雌性小，生長速度，受環境溫度影響，如在攝氏 25 度中，果蠅由卵成長至成蟲大約 11 天，溫度越低時間越久，如 18 度的時間約是 25 度的 2 倍，16 度時約是 3 倍。



2.2 實驗過程

這實驗簡稱 Behavioral Analysis[4]，用來觀察果蠅睡覺狀態並且記錄其睡覺資料，最後再整理這些實驗資料，研究統計出所需的格式資料。以下為 Behavioral Analysis 流程圖：



圖[2-1]流程圖

做 circadian analysis 實驗，如圖[2-1]所示，一開始先準備實驗組(改變基因)跟對照組(野生)的果蠅，飼養方法可以參考備附錄，這裡選用成長約 3~7 天大的果蠅，將兩組果蠅分別裝入標準直徑長 2mm*60mm(管長)的實驗透明管子裡，一隻裝入一管即可，一組有 32 隻(一排 16 隻，有 2 排)，放入觀察實驗機器中，將

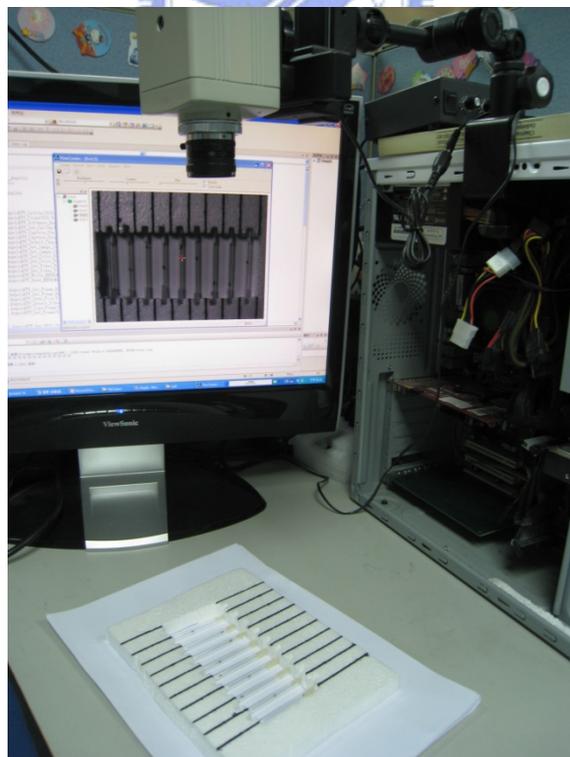
環境溫度控制在 25 度左右，而 Behavioral Analysis 實驗機器會利用紅外線穿過管子中間感應，因為果蠅看不見紅光，其活動行為不會受紅外光所影響，所以選用紅外線來做實驗，當果蠅經過紅外線時實驗機器會自動記錄為 active，一分鐘統計果蠅經過紅外線幾次的行為記錄在.txt 檔裡，每一行代表一分鐘的次數，而一個.txt 檔案為一隻果蠅每分鐘所 active 的資料，因為統計資料需要好幾組果蠅資料來比較統計，資料量[6]會非常龐大，所以需要一個分析程式來計算轉換成所需的資料格式(流程圖第 3 個)，此分析程式在第 4 章會詳細介紹，以上就是 Behavioral Analysis 實驗的簡介。



第三章 實驗流程

3.1 實驗簡介

由於第二章的 Behavioral Analysis 的實驗是要果蠅經過紅外線才會偵測到，是屬於被動偵測的形態，所以很有可能果蠅長時間(超過 5 分鐘)都在管子另一邊活動反而被誤認為睡覺，因而影響統計資料的準確性，所以本論文研究用另一種主動偵測實驗方式(如圖[3-1])來偵測果蠅活動，使得到的資料更為準確，改善其上述缺點，以便未來能更加準確觀察及研究統計果蠅睡覺行為等。Behavioral Analysis 實驗只能得知果蠅睡眠數據資料，而不能知道果蠅 active 狀態的移動資料，本實驗也可提供果蠅移動資料，以便觀察研究。



圖[3-1]主動偵測

本實驗鏡頭距離偵測物(果蠅)高 40 公分,照射面積約為 13.8(cm)*10.5(cm) 平方公分。

本論文研究主要分成六大部分,前五部分分別在第三章介紹,第六部分則稍後會在第四章介紹,分別如下面幾個部分:

一、自動擷取果蠅培養管影像,運用影像處理方法分析,判斷果蠅培養管影像是否位於偵測區域,以及區分各果蠅活動範圍。

二、透過本研究所設置的硬體架構,取得連續性果蠅培養管活動影像。

三、將連續性果蠅培養管影像,應用影像相減(Image Subtraction)方法,獲得單位時間內的果蠅活動變化。



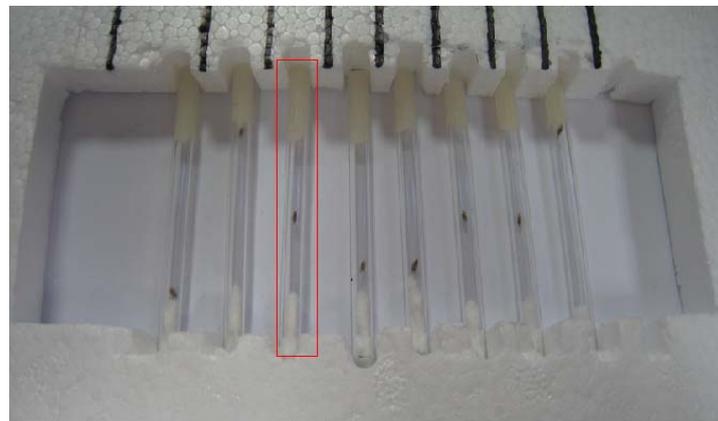
四、將第 2 部分所獲得的二值化影像,以分析其影像灰階直方圖(Histogram)分佈,透過閾值(Threshold)的選取,去除影像多餘雜訊,進行果蠅活動偵測且記錄,將單位時間內果蠅活動變化資料輸出至檔案。

五、模擬 Behavioral Analysis 實驗,其資料可以用來比較主動跟被動偵測的差異。

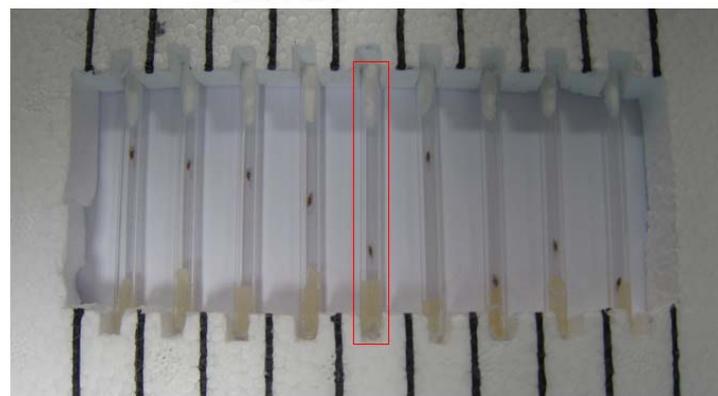
六、將第四部分所取得果蠅活動變化資料,轉檔為一般研究資料且統計分析其果蠅睡覺種種情況,例如:Sleep Latency、Sleep bout duration、Sleep time duration、等等相關研究資料。

3.2 果蠅合法區域偵測

如圖[3-3]範例(A)及(B)，要偵測每隻果蠅活動區域範圍，也就是果蠅在標準管裡的活動區域，並把每一個區域分隔開且標記起來，下圖紅色長方形標起的區域，如(A)範例一即為果蠅3號活動區域，(B)範例二即為果蠅五號活動區域，其它以此類推，把每隻果蠅活動區域標示起來，未來用來偵測觀察各果蠅睡眠行為，分別記錄，以下小節會分別介紹。



(A)範例一

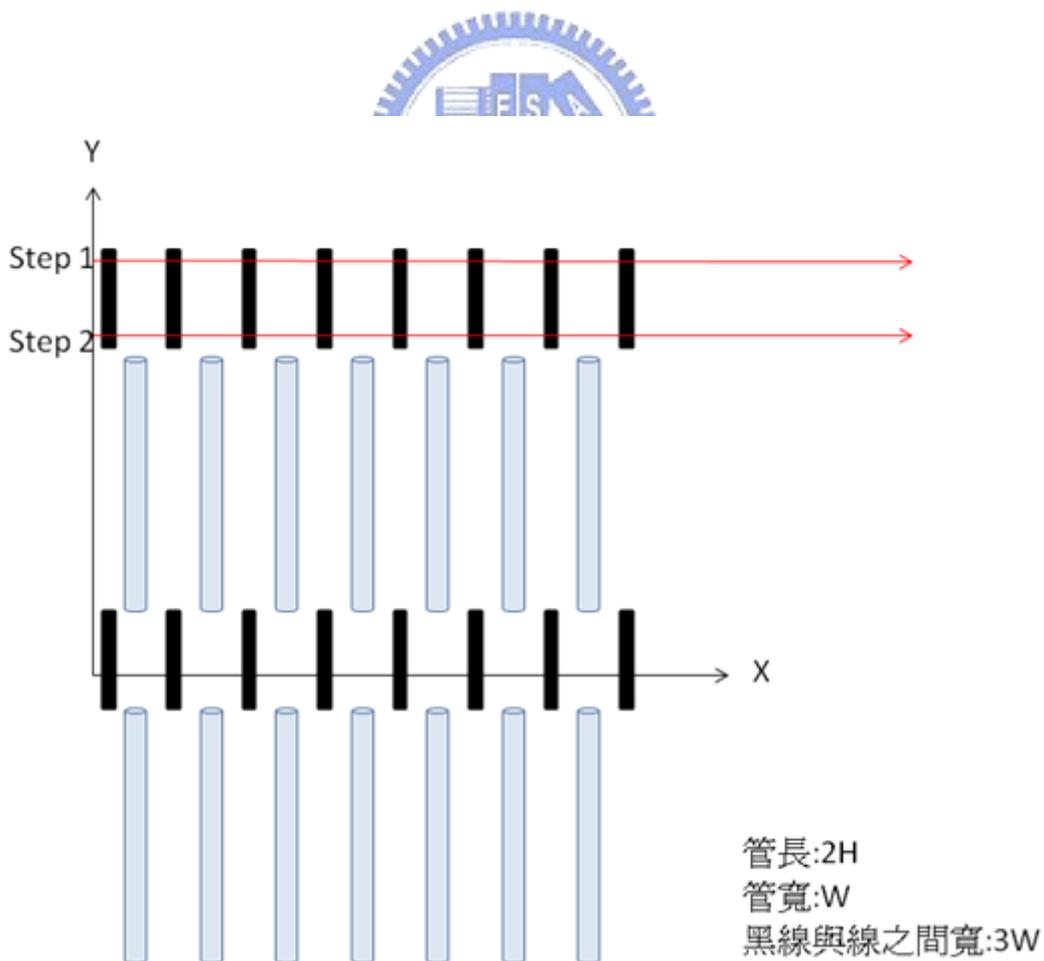


(B)範例二

圖[3-3] 偵測邊界

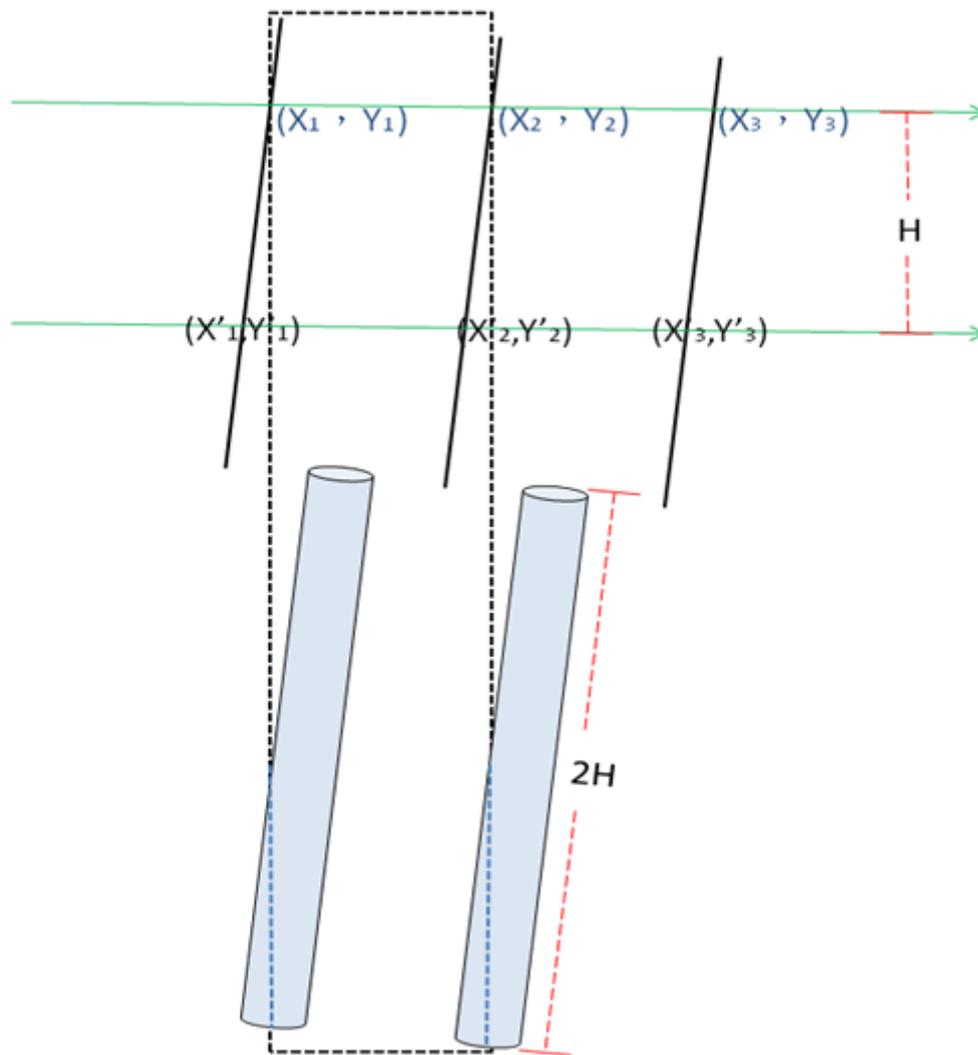
本研究偵測邊界區域的範圍方法為標記(Mark)法，如圖[3-3]範例一在每支果蠅管子與管子之間都用黑色直線作為標記。如下圖[3-4]所示，偵測方式如下：

Step 1.先沿著上排 X 軸方向掃描(紅色的線)，並記錄紅線與黑線交叉點的(X,Y)位置。Step 2.同 Step 1。兩條紅線距離為 H 高。果蠅標準管寬度為 W，標準管長為 2H，每兩條黑線距離是 3W 長，可以根據交叉點位置、管寬、管長，黑線寬，來檢測一開始擺放位置是否為正確區域。第二排黑色線也是以此類推可以推算及判斷第二排或第三排等等果蠅活動區域是否正確，當 Camera 解析度越高，即可做越多排果蠅實驗，本實驗都以一排果蠅研究為範例。而 H 及 W 值會隨著焦距不同而變化，所以要事前先計算。



圖[3-4]

如圖[3-5]可以發現偵測果蠅管位置放歪了，導致偵測區域(如下眠黑色虛線框框)不正確，因而會造成所偵測區域資料錯誤，必須重新放置再偵測。以下為所檢測區域是否合法的公式推導。



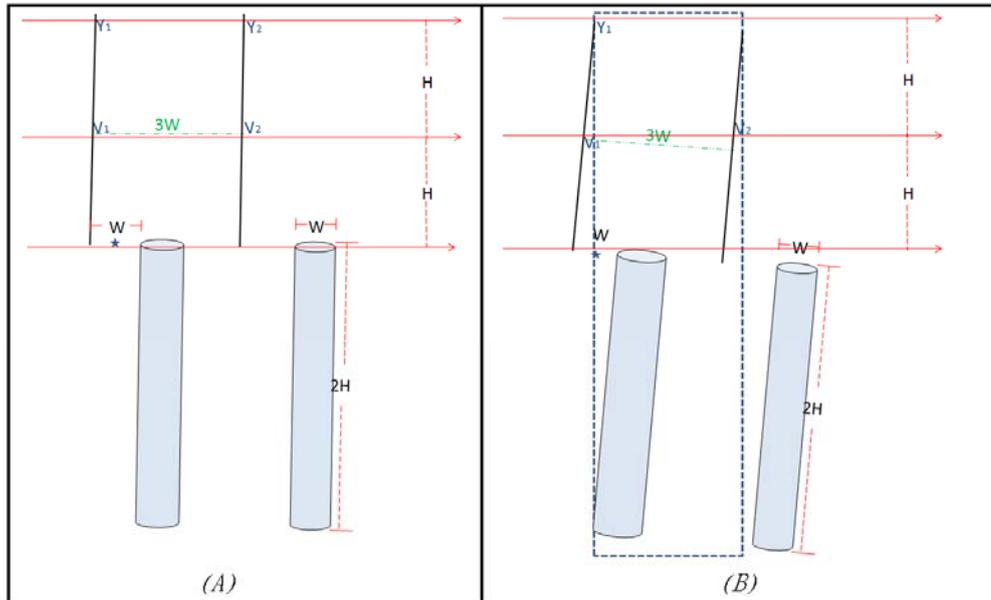
圖[3-5]

檢測定義如下:

$|Y_i - V_i| < Threshold(W/4)$, 成立表示邊界偵測正確
 , 不成立則需重新調整果蠅位置

此定義推導為如下圖[3-6]，標準管寬為 W ，標準管長為 $2H$ ，黑線與黑線間距離為 $3W$ ，因為黑線小於 $(2H)$ ，最糟合法情況如下圖(B)，假設黑線為 $2H$ 長，追蹤紅線剛好位在黑線最上端，以星號為基準點旋轉，黑線長為 $2H$ 最上端點會向右移動 $W/2$ 距離，管長為 $2H$ 最下端點會向左 $W/2$ 距離，合計為 W ，而管子與黑線正長寬為 W ，正好相消，所以為最糟合法位置。

因為兩條紅色追蹤線高為 H ，上下紅色追蹤線 Y 軸點可相差 $W/4$ 距離，所以定義為 $Y_i - V_i < W/4$ ，反轉另一邊即為 $V_i - Y_i < W/4$ ，取絕對值即可，所以下圖(B)是最極限剛好情況，藍色虛線區間即為果蠅活動偵測區域。

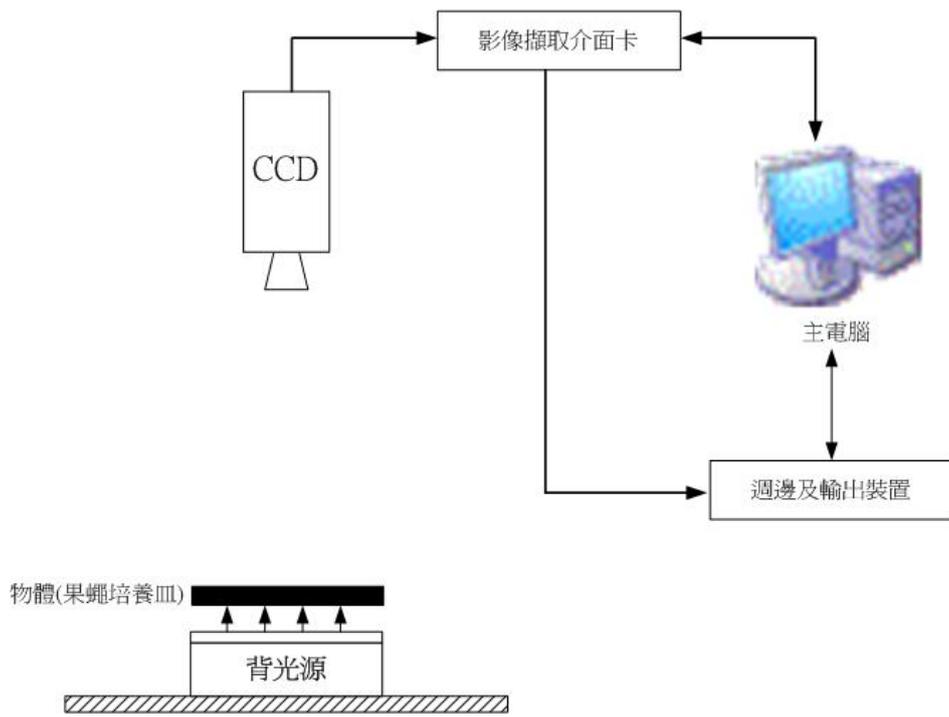


圖[3-6]

3.3 果蠅主動偵測硬體架構



本實驗所需硬體架構示意圖如圖[3-7]，下面會一一介紹所需硬體

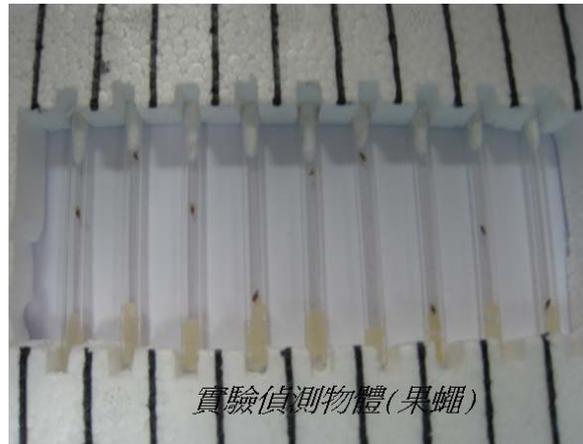
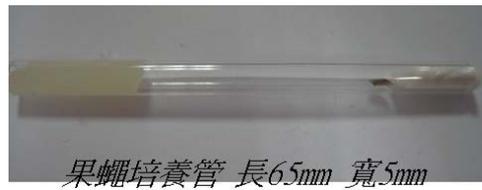


圖[3-7] 示意圖



所需硬體如下圖[3-8] (A)物體(果蠅) 、 (B) CCD CAMERA 、 (C) 紅外光源 、 (D) 移動手臂、(E) 影像擷取卡及電腦周邊:

A. 果蠅(果蠅培養皿)



圖[3-8]

B. CHIPER(巨普)星光級數位式高解析黑白攝影機 Model : CPT-BXH70
CCD CAMERA 如圖(B) , 解析度為 640*480



圖[3-8]

- C. 力丞儀器科技有限公司 KDDR-LA Series 紅外光源 LED 低角度夜間照明，
因為果蠅看不見紅光，本實驗用紅外光源來當夜間輔助照明



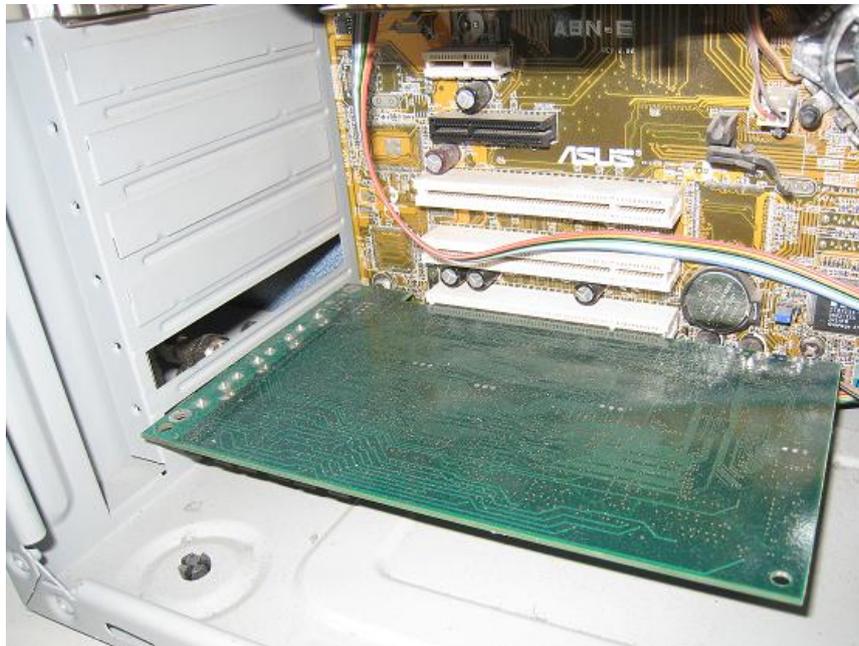
圖[3-8]

- D. 可移動手臂，可有 4 種調整方式如下圖所示



圖[3-8]

E. ADLINK(凌華) Frame grabber(影像擷取卡)RTV-24，每秒可擷取 30 張影像



圖[3-8]



3.3 影像相減(Image Subtraction)及影像處理

要偵測移動物體，主要有兩種方法[5]:

1. 背景相減法(Background subtraction)
2. 連續影像相減法(Temporal differencing)

背景相減法原理是先建一個背景模型，然後對影像作一對一像素亮度相減，而得到所偵測的物體，優點是所偵測的物體比較完整以及不會像連續影像相減法有物體內部碎裂問題，是目前比較熱門的方法。

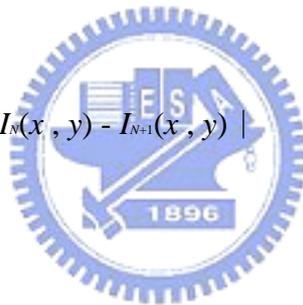
連續影像相減法(Frame Difference)來偵測移動物體，其原理是利用時間上連續影像做一對一影像像素(Pixel)相減，若差異為零表示沒有移動，反之則有，而

其缺點是常常會產生內部破碎狀況。

本實驗是採用連續影像相減法，其原因在於觀察果蠅時，使用背景相減法所建立背景模型對本實驗費時費工且不是很準確，而觀察果蠅時會產生排泄物對背景模型會有誤差影響其準確度，以及日間及夜間偵測要使用不同的背景模型等等問題。而雖然使用連續影像相減法有內部碎裂問題，但對於本實驗沒有很大影響願採用，連續影像相減法如下。

$I_N(x,y)$ 及 $I_{N+1}(x,y)$ 為相隔單位時間的連續影像，而對這兩張影像 $I_N(x,y)$ 、 $I_{N+1}(x,y)$ 像素相減，而得到一張新的影像結果為 $R_N(x,y)$ ，本實驗單位時間訂為一秒鐘。定義如下：

$$R_{N+1}(x, y) = | I_N(x, y) - I_{N+1}(x, y) |, \quad \text{所有}(x, y)\text{像素值}$$



由於以上定義取絕對值會造成相減完有前景物體(前一秒果蠅位置)跟後景物體(目前果蠅位置)同時出現，使的判斷物體有 2 個不清楚，所以本實驗保留後景物體(目前果蠅位置)定義如下：

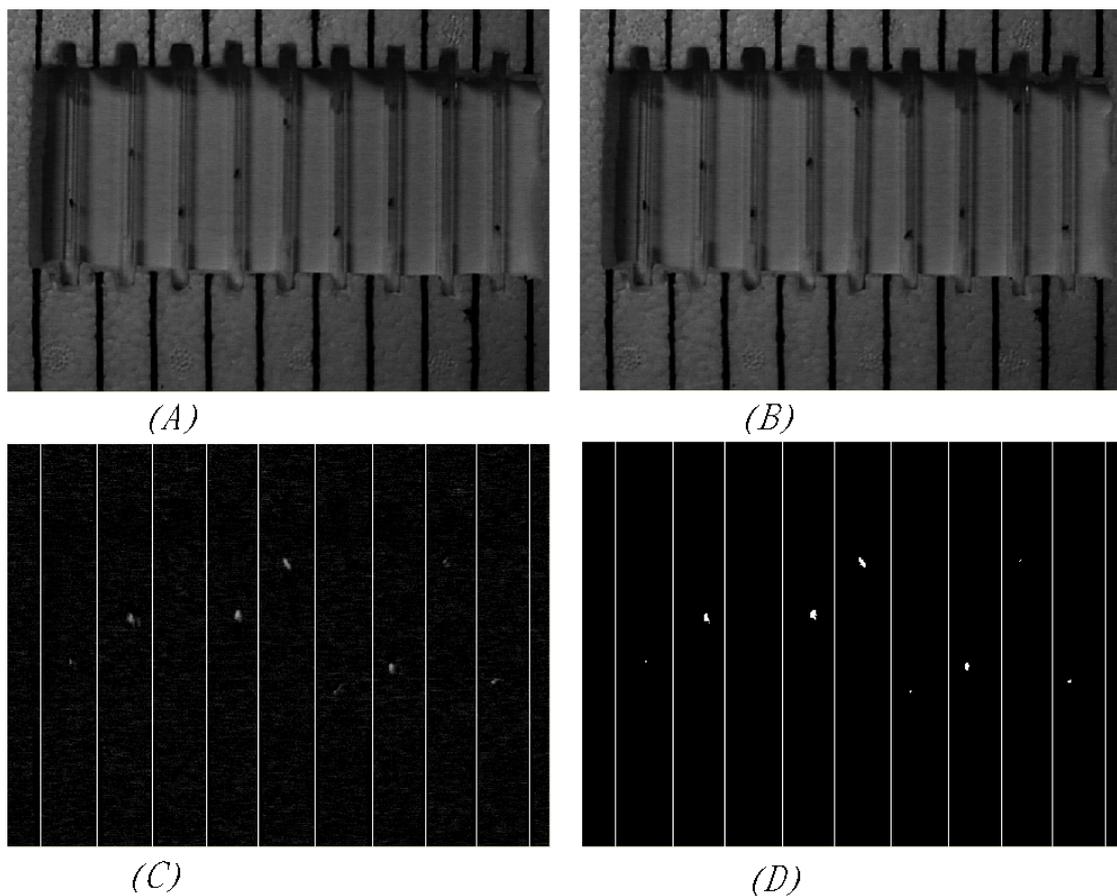
對所有 (x, y) 位置的像素

$$I_{N+1}(x, y) - I_N(x, y) < 0, \quad R_{N+1}(x, y) = I_N(x, y) - I_{N+1}(x, y)$$

$$\text{反之, } R_{N+1}(x, y) = 0$$

相減完結果如下圖[3-9]所示:

下圖(A)及圖(B)為連續影像相隔一秒鐘。圖(C)為連續影像(A)、(B)相減結果，白線為區分各果蠅活動區域位置，由圖(C)可以看出有一些雜訊訊號，而會影響果蠅位置判斷。圖(D)為做過影像處理取閾值所得到的結果，可明顯看到果蠅單位時間內移動痕跡，幫助電腦視覺更準確判斷。



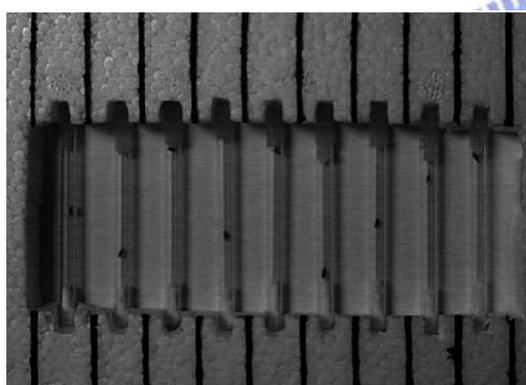
圖[3-9]

3.4 去除雜訊(Denoise)及輸出結果至檔案

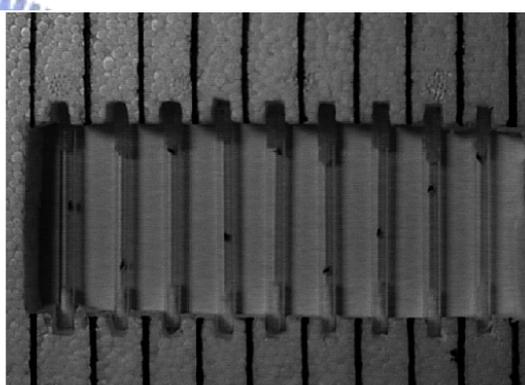
影像相減完後得到二值化影像圖，所產生的雜訊如圖[3-9](C)，而這些雜訊

會影響果蠅區域的判斷，所以必須經過影像處理去除雜訊，才能使得所得到影像讓電腦視覺更容易及準確判斷果蠅所在區域，而經過統計圖圖[3-10](D)所示，這些訊號都屬於低頻訊號，所以使用減低低頻(Low frequency)雜訊，圖[3-9](E)為(C)經過減低低頻訊號處理過影像。

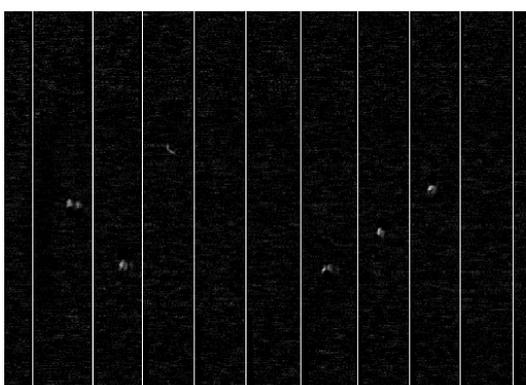
本論文是利用直方圖來統計低頻訊號分佈為何，在固定環境變數下，低頻訊號有一定的分佈，所以可以經直方圖統計取一個閾值大於低頻訊號來去除雜訊，使得果蠅移動情形更為明顯準確，而不會被雜訊所影響結果。



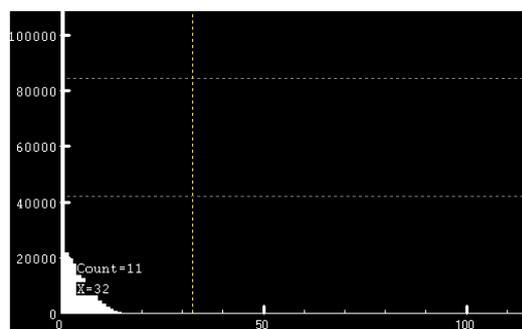
(A)



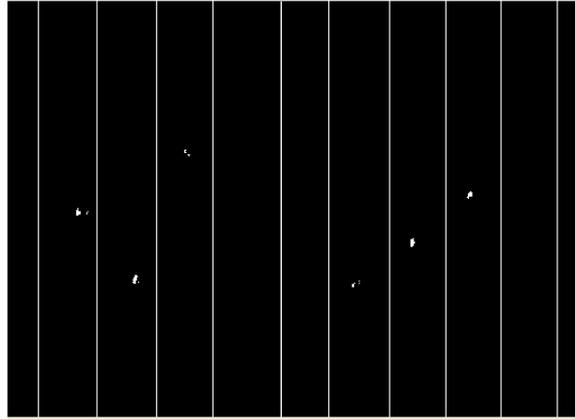
(B)



(C)



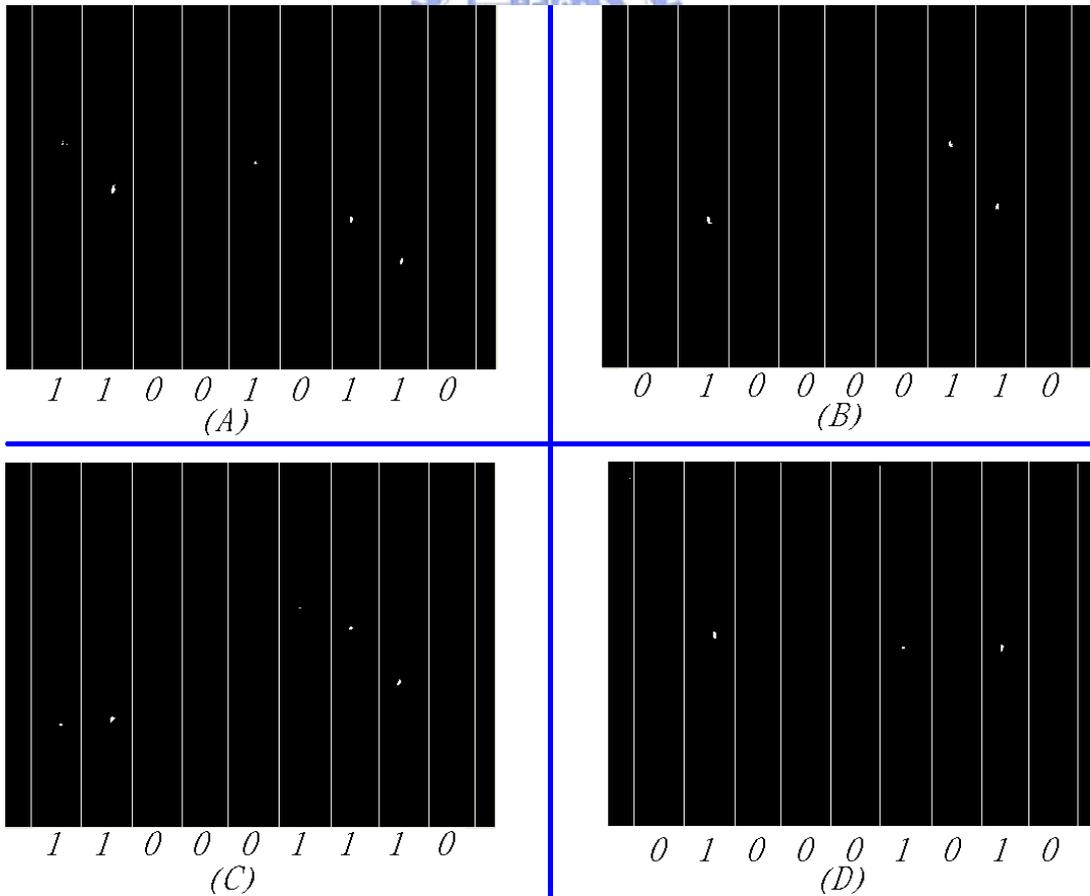
(D)



(E)

圖[3-10]

去除雜訊後如圖[3-10](E)，要把果蠅移動資料輸出至檔案，因為把全部影像存下來，時間一久資料量及為龐大，成本消耗不合，所以要把果蠅移動資訊進而轉為二進位數值儲存至檔案，把果蠅移動設為 1，靜止狀態設為 0 如圖[3-11]所示：



圖[3-11]

圖[3-11](A)、(B)、(C)、(D)為間隔 30 秒活動情況圖(A)得到數值為 110010110 為一串 0 1 所組成的資料，其他也是以此類推。最後輸出至檔案.txt 檔得到一串 0 1 組合數值，一行表示一秒鐘果蠅移動情形，一列表示一隻果蠅移動數據表示法如下：

```

....
010011110
010001110
010001010
110011010
010011110
010011100
110001100
110001000
010001100
010001100
010001100
011001100
010010100
010000110
010000110
010001110
010001110
....

```



以上有 9 列表示有 9 隻果蠅移動數據資料，有 17 行即為 17 單位時間移動數據，例如果蠅 1(第一列)在單位時間 4、7、8 都有移動，其他果蠅資料以此類推，本研究單位時間為一秒鐘。

因為定義果蠅睡眠行為為連續 5 分鐘為 0 代表果蠅在睡眠，也就是 300 秒為 0，本研究資料為果蠅連續 300 行數據為 0 代表為睡眠。一般研究都以分鐘為

單位時間，所以第四章有轉換程式幫助轉換成為一般資料研究，分別把每一列即每隻果蠅資料轉為各個不同的.txt 檔裡，單位時間由秒轉為分鐘計算其移動次數。

3.5 模擬 Behavioral Analysis 實驗

本實驗也可模擬 Behavioral Analysis 實驗，在偵測物體中間取一直線區域偵測，如下圖[3-13]紅色線區域，有果蠅經過就記為 Active 狀態，輸出到檔案內，檔案格式如同 3.4 小節一樣，其原理也是利用影像相減法判斷果蠅移動位置是否位於圖中紅線上區域，果蠅經過一次在第一秒記錄為 1 接下來為 0，表示整隻果蠅經過一次才算一次，判別法如下：

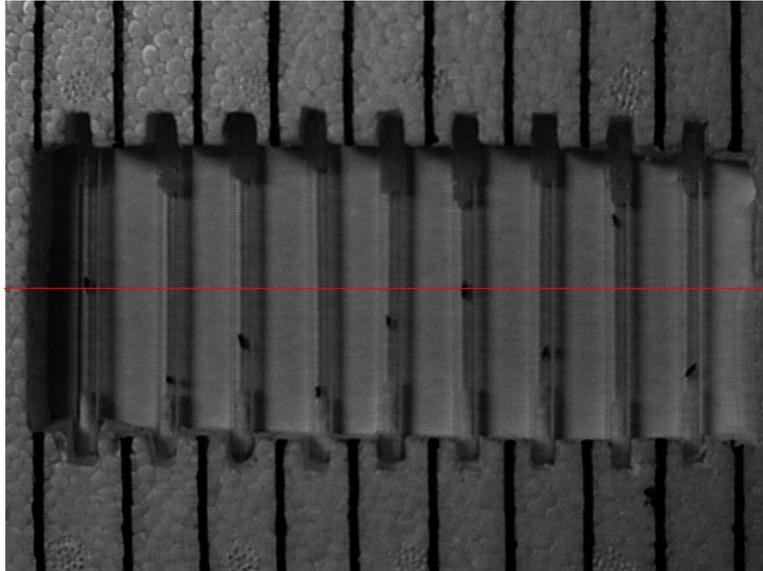


前一秒是否在紅線上，

YES ，已經記錄過，所以記為 0。

NO ，表示第一次碰到紅外線，所以記為 1。

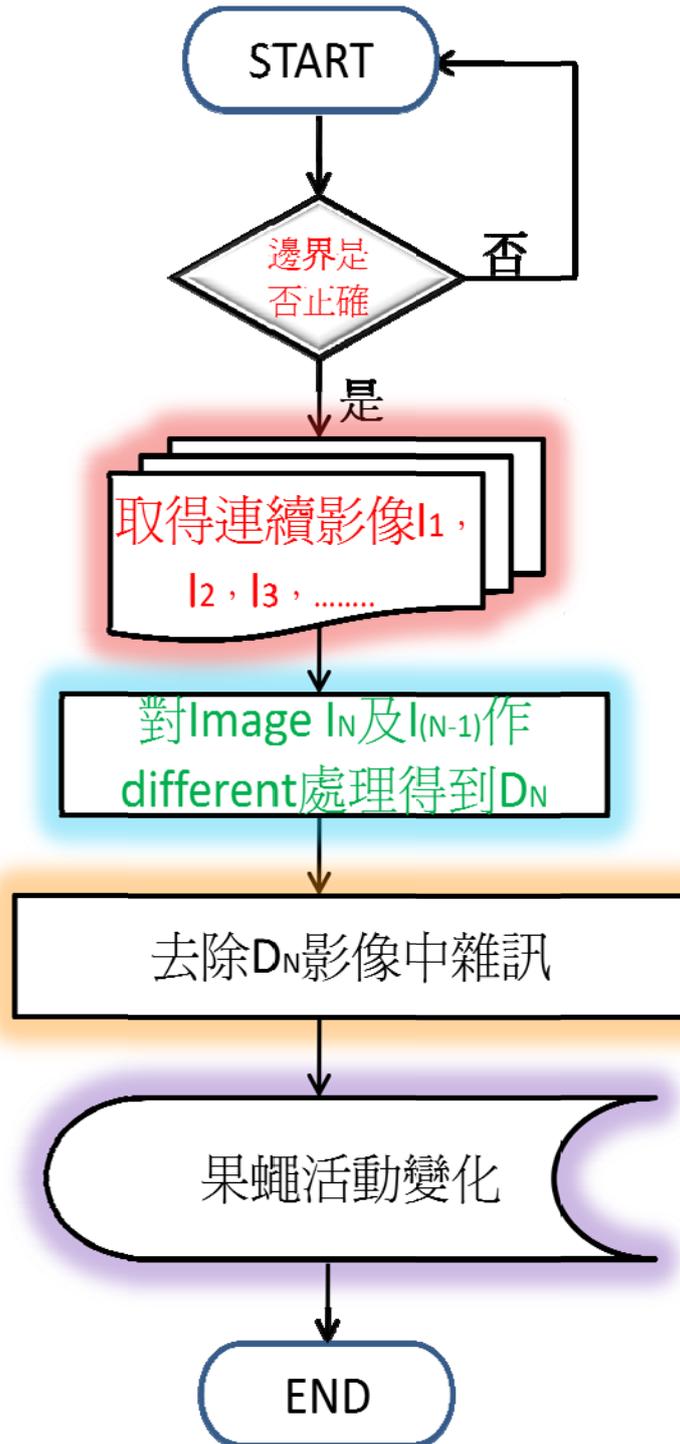
本實驗正中間線偵測計數當成 Behavioral Analysis 實驗的紅外線計數。可以藉由此模擬數據比較 Behavioral Analysis 實驗(被動偵測)跟本實驗(主動偵測)的移動資料差別。



圖[3-12]

3.6 實驗流程

本論文流程圖[3-13]如下，一開始 start 先檢查所要偵測果蠅活動區域的邊界，檢查邊界是否正確，假設不合法就重新設置果蠅標準管位置，接下來利用影像擷取卡每秒鐘連續擷取影像為 I_1, I_2, I_3, \dots 等，然後對連續影像每連續兩張 I_N 及 I_{N-1} 影像作一對一像素相減，而得到新影像 D_1, D_2, D_3, \dots 等，而對影像 D_N 作減低低頻(Low frequency)訊號得新影像 T_N ，然後由電腦視覺去偵測每隻果蠅移動區域及記錄其活動資訊，最後再轉換所需研究資料格式即可。

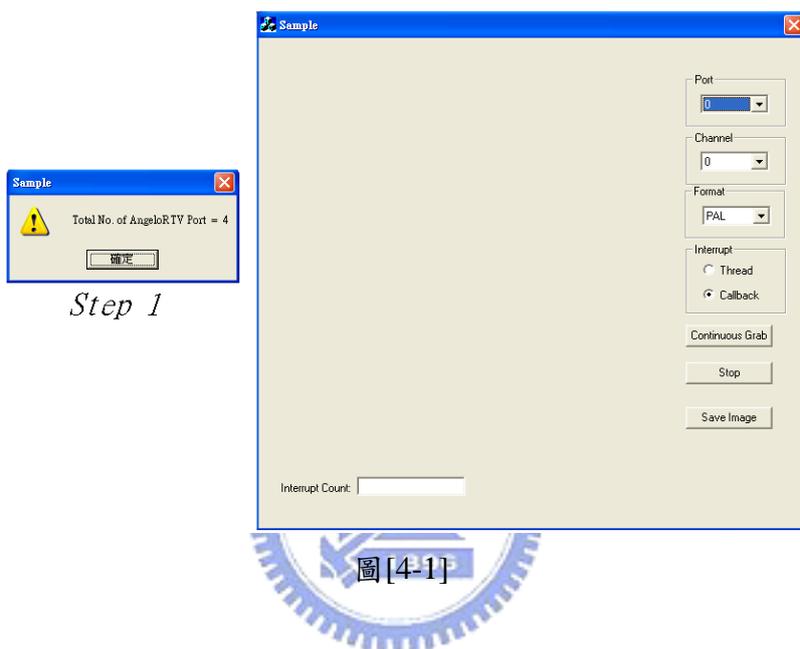


圖[3-13] 主動偵測流程圖

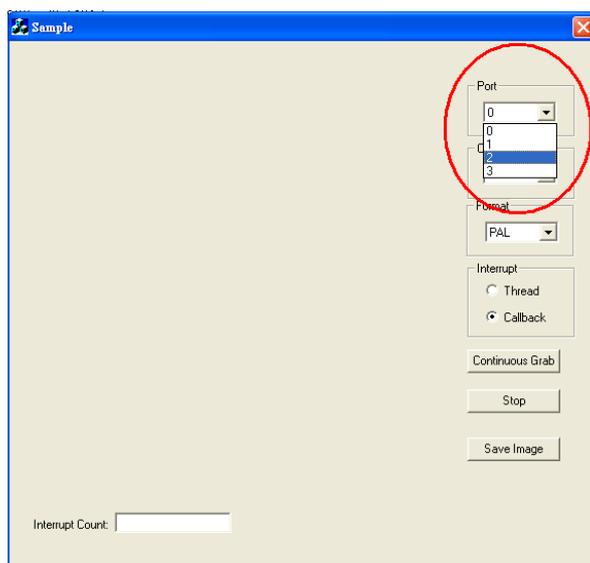
第四章 統計分析及實驗結果

4.1 操作介面使用

Step 1 圖[4-1]左圖是開始畫面，按下確定鍵之後就會出現圖[4-1]右圖

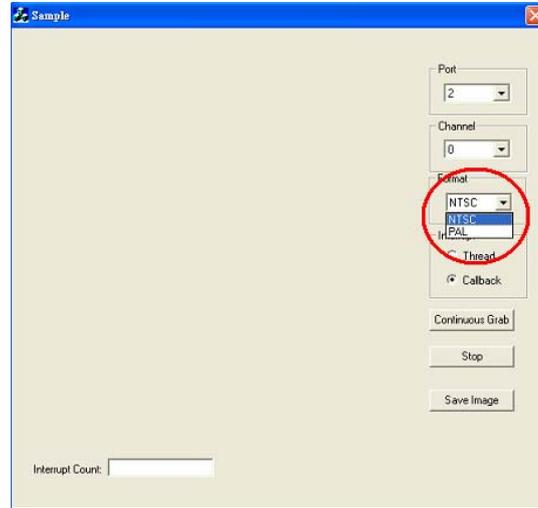


Step 2 選擇所要用的 CAMERA 所接的 Port 位置，影像擷取卡提供四個 port



圖[4-2]

Step 3 選影像格式，本實驗用 NTSC 格式



圖[4-3]

Step 4 選擇 Input，圖[4-4](A)是 Thread 畫面、(B)Callback 畫面，本實驗選 Callback 及時運算比較快。

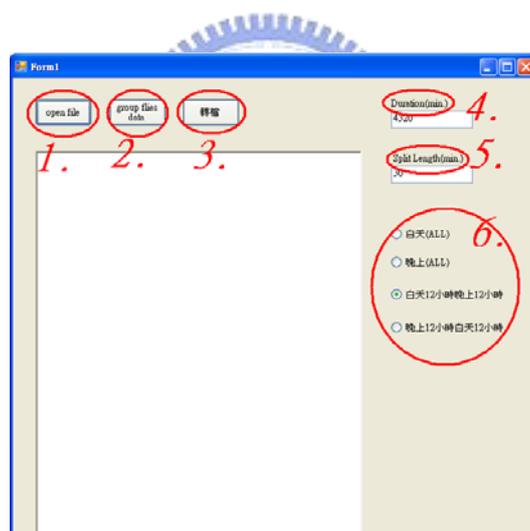


圖[4-5]

4.2 資料轉換及統計分析

由於本實驗資料為每秒鐘記錄，而一般研究為分鐘為單位研究，所以要把本實驗研究資料轉為每隻果蠅每分鐘移動資料(圖[4-3]第3點)，一些常用的統計資料為 sleep time number、sleep bout number、sleep latency、CI 值等等，大部份統計資料可觀察基因改變之後睡眠狀態是否改變，Sleep Latency 可以知道多久時間會入睡，CI 值可以觀察是否熟睡狀態等等，藉由這些資料來觀察研究果蠅睡眠情形。

因為果蠅睡眠資料龐大，所以利用程式來統計計算，加快且方便觀察實驗資料，下方為本程式的使用者介面，介紹如下：

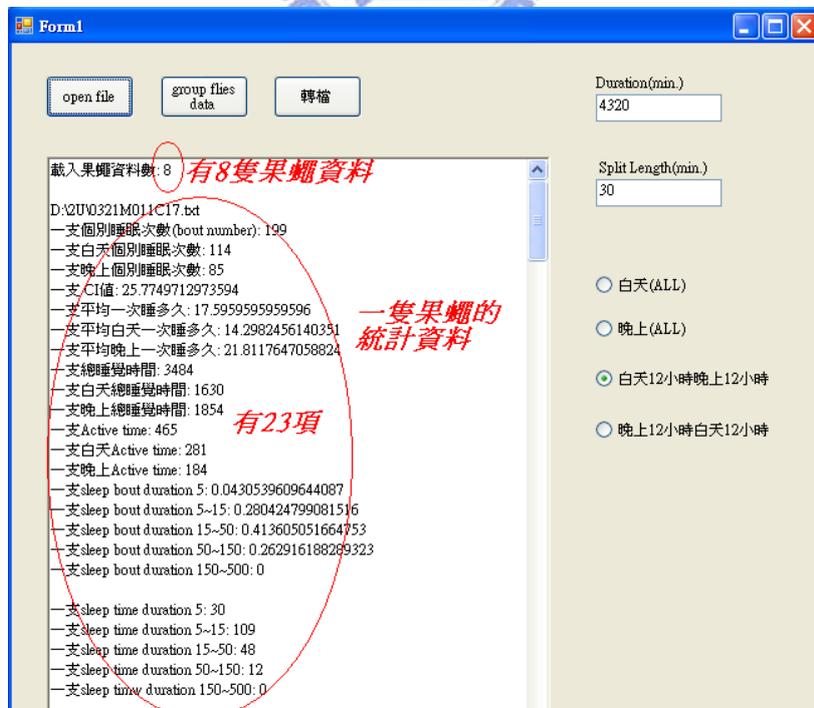


圖[4-6]

圖[4-6]有 6 個功能，分別如下：

1. Open file 鍵，是用來開檔並計算每一隻果蠅睡覺實驗的資料，並分別顯示在下方上，且存入 Active time.txt 檔、Result.txt 檔、Sleep Latency.txt 檔、Split_Out.txt 檔、SplitRow_Out.txt 檔，以方便未來做統計圖，計算項目包含如圖[4-7]中 23 項。

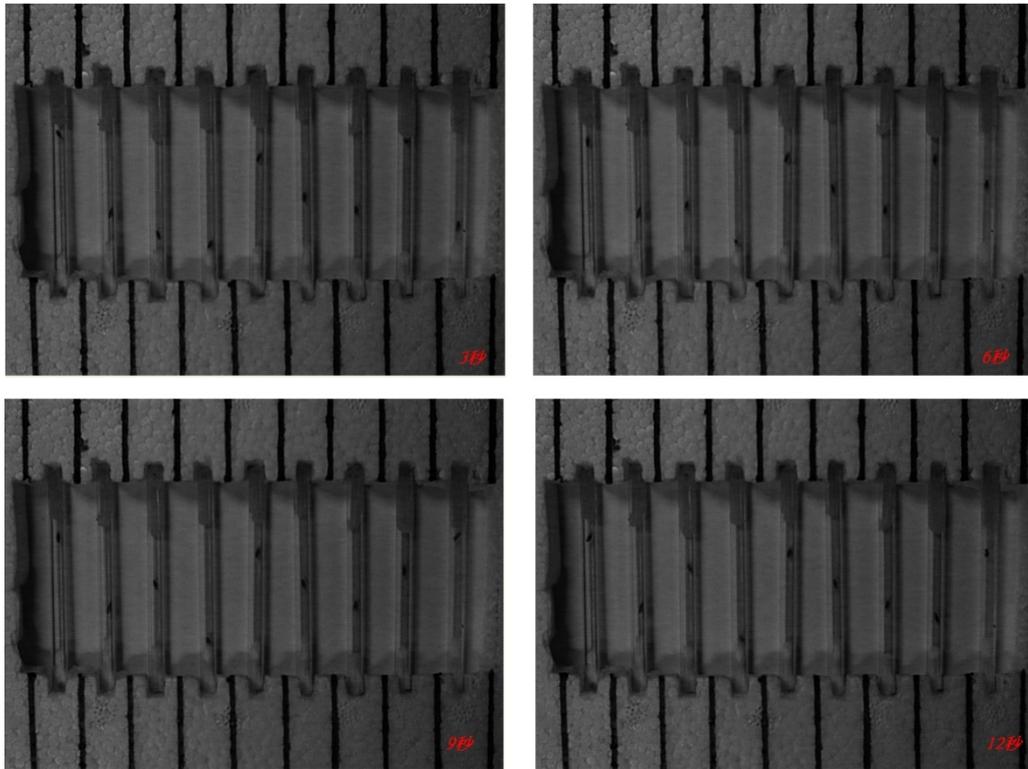
2. Group files data 鍵，把上部所有果蠅資料平均且算出標準差，也顯示在下方同圖[4-7]，並存入 groupStatistic.txt 檔中。
3. 轉檔鍵，把本論文實驗資料轉為一般用的研究數據檔案，再去計算上述 1、2 點。
4. Duration(min.)，輸入想研究果蠅睡覺時間長短，例如一天、兩天、三天等等，單位為分鐘，基本設定為 3 天(4320 分)。
5. Split Length(min.)，基本設定 30 分為間隔。
6. 果蠅培養環境，基本設定白天晚上各 12 小時順序交替。

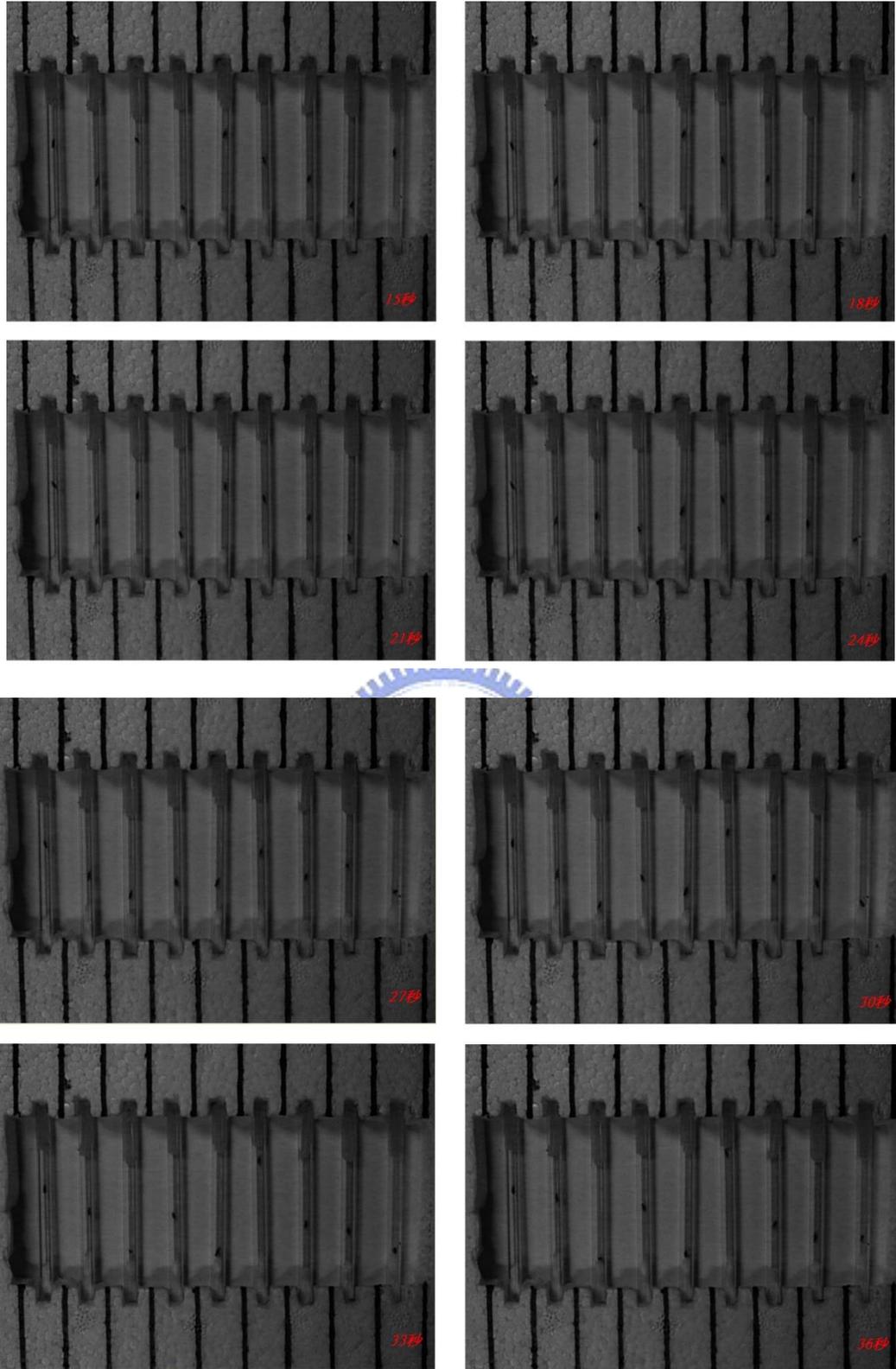


圖[4-7]

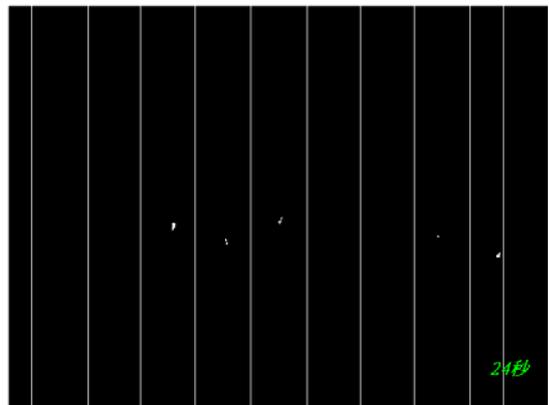
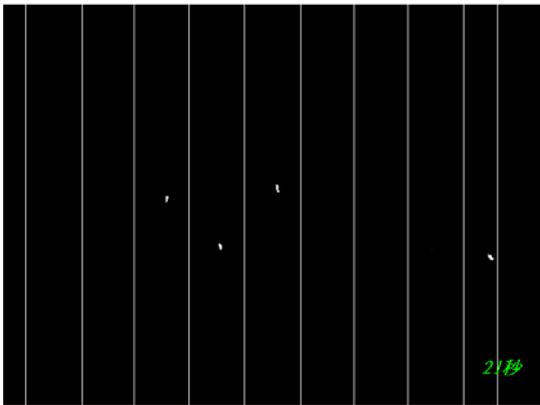
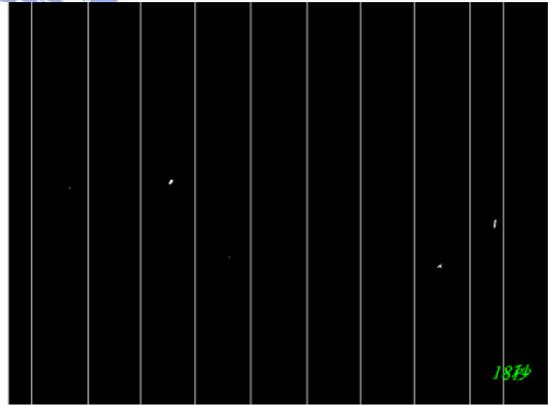
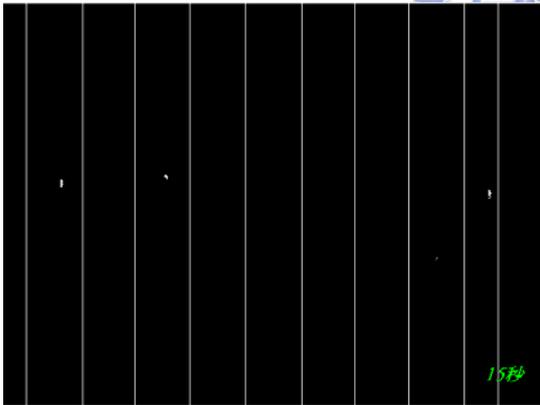
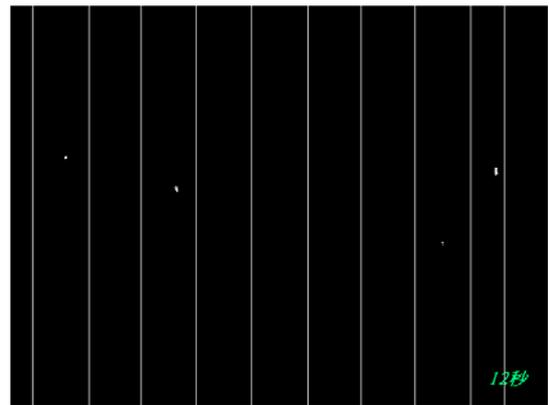
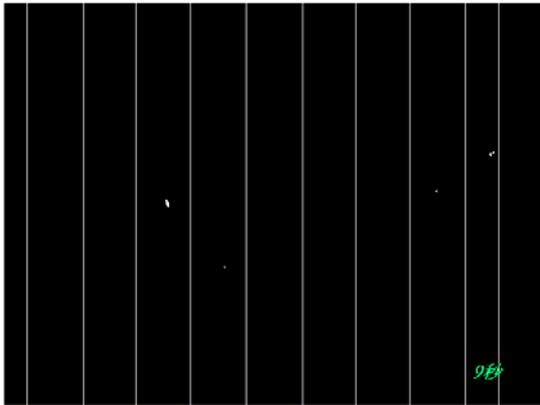
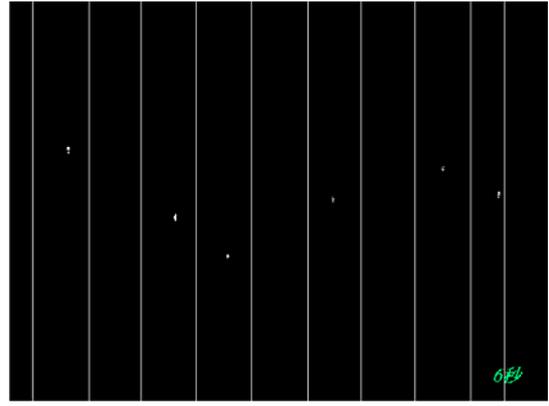
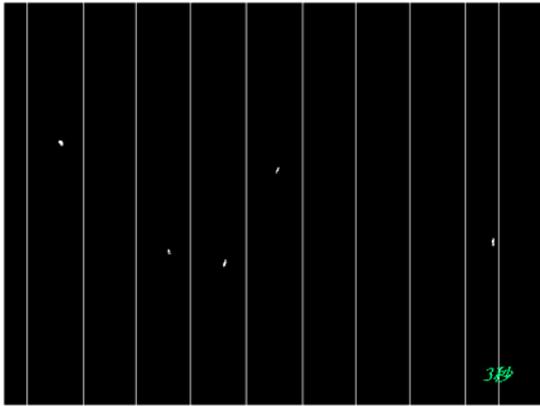
4.3 實驗結果、統計資料及結論

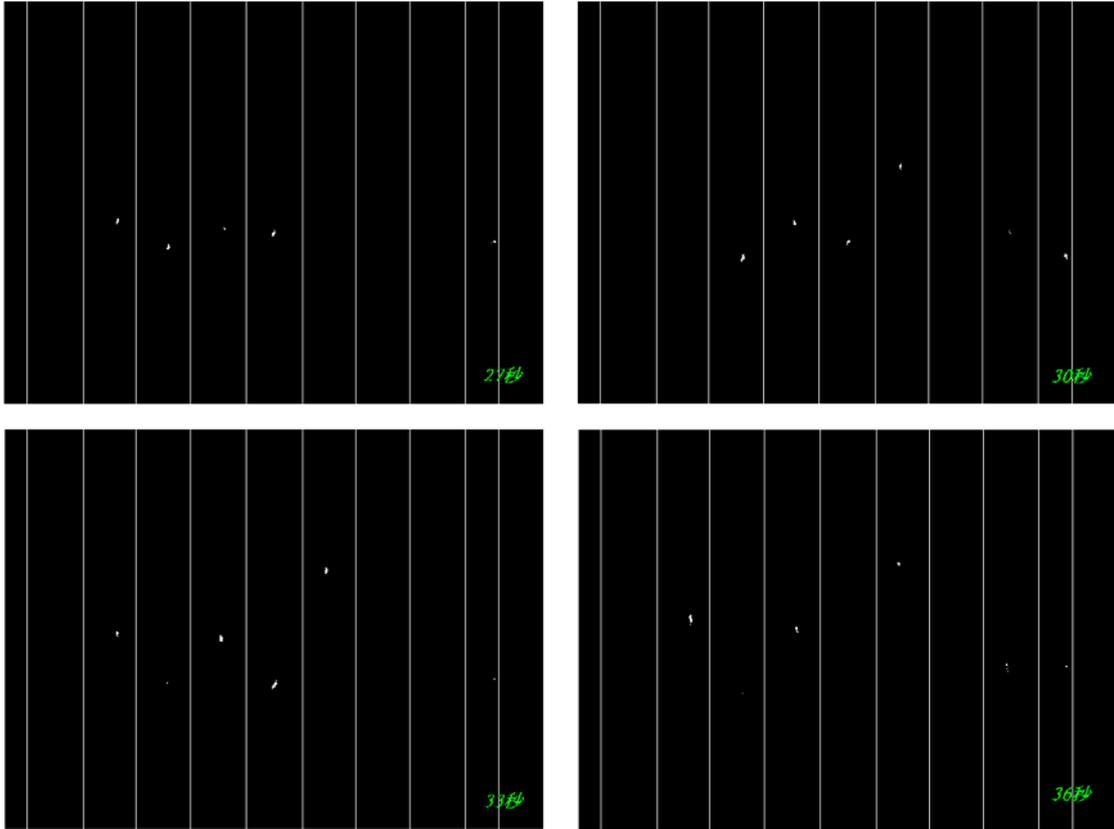
一、白天偵測結果，下圖[4-8](A)是 36 秒連續影像實驗，每 3 秒擷取一張影像實驗結果，圖[4-8](B)為[4-8](A)做完影像處理結果，圖[4-8](C)為文字資料。





圖[4-8](A) 白天連續擷取 12 張影像



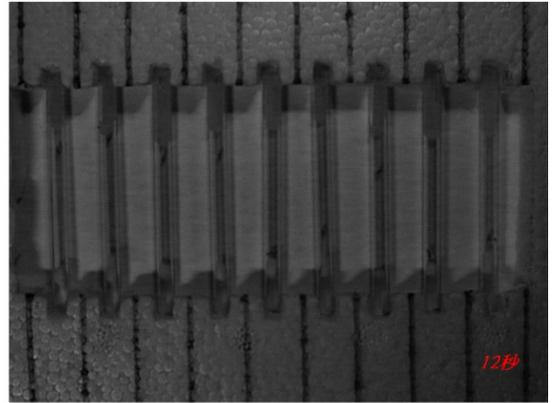
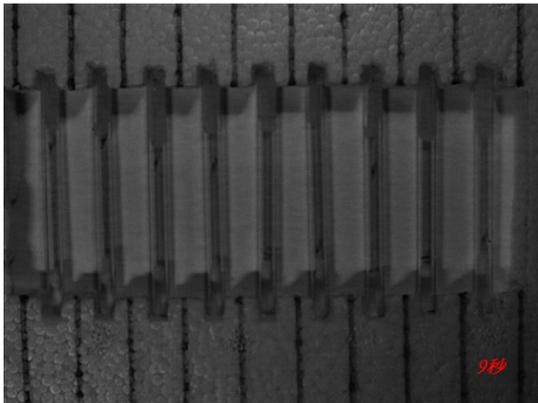
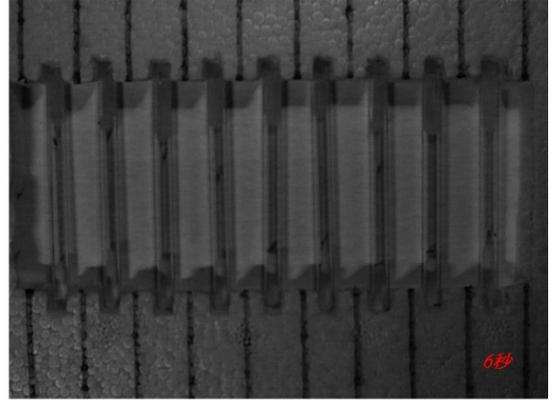
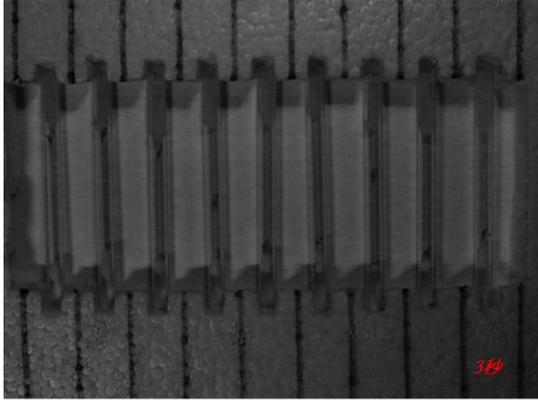


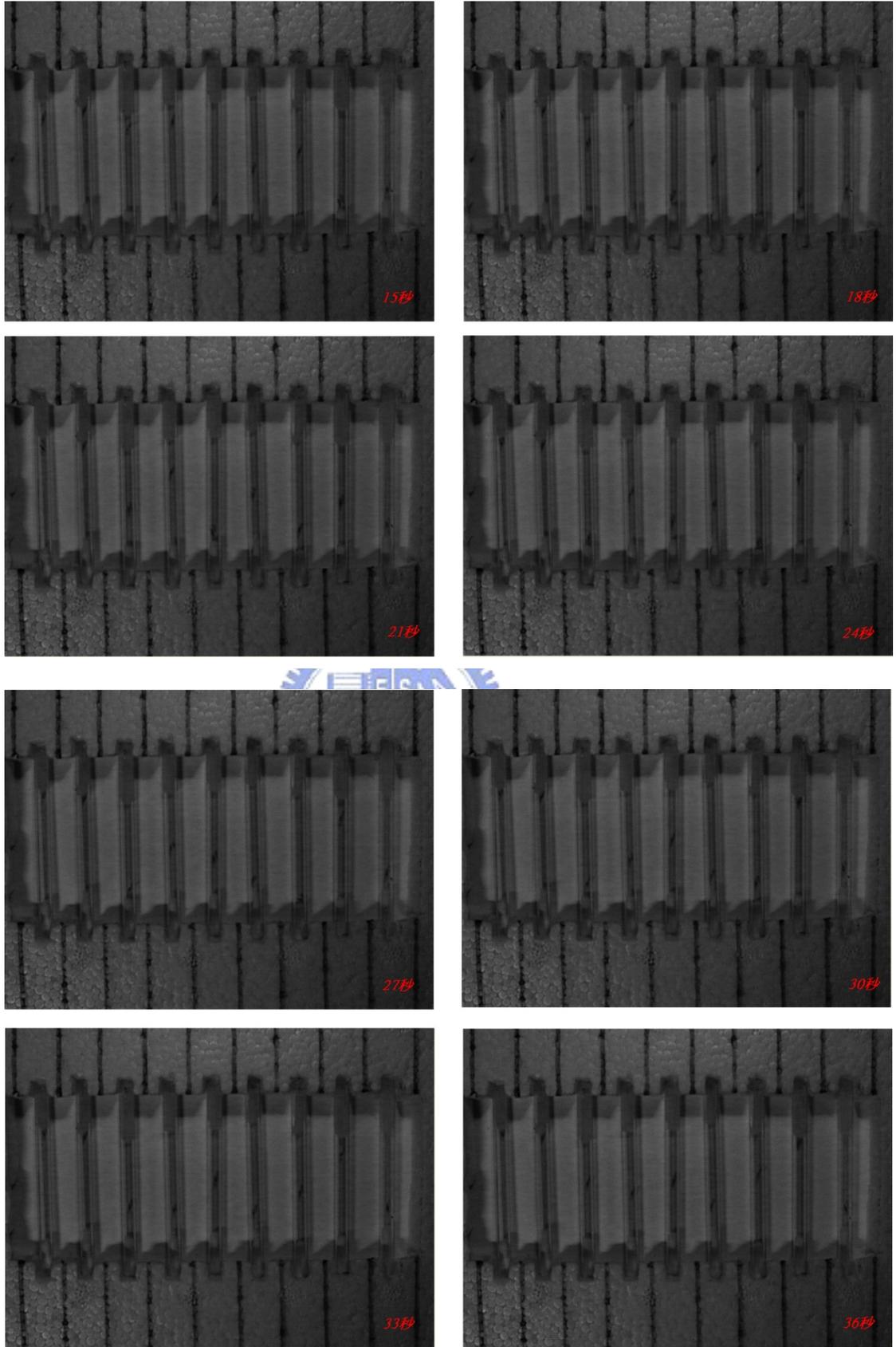
圖[4-8](B) 閾值取 40



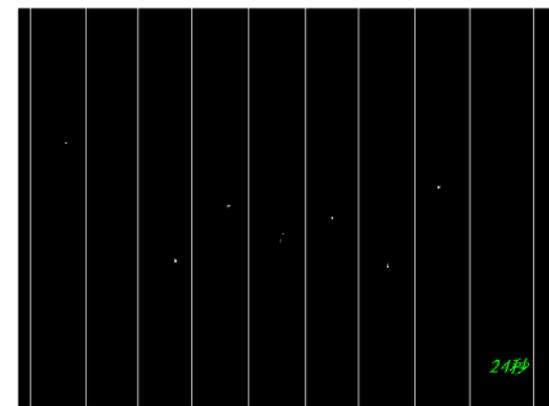
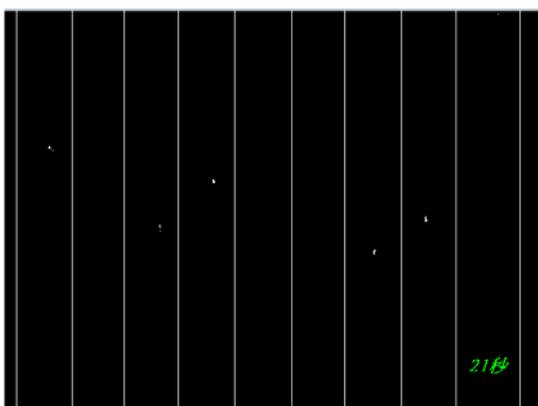
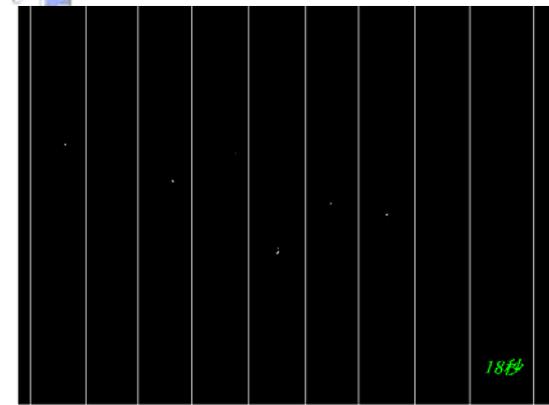
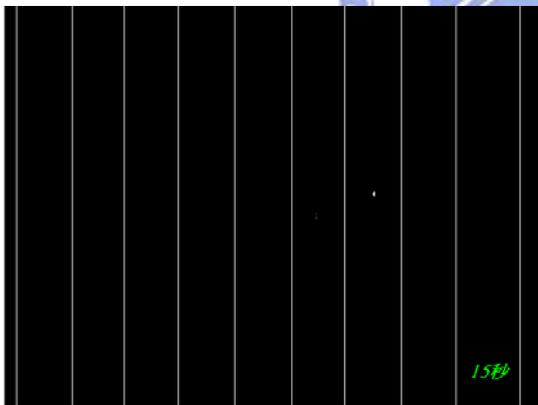
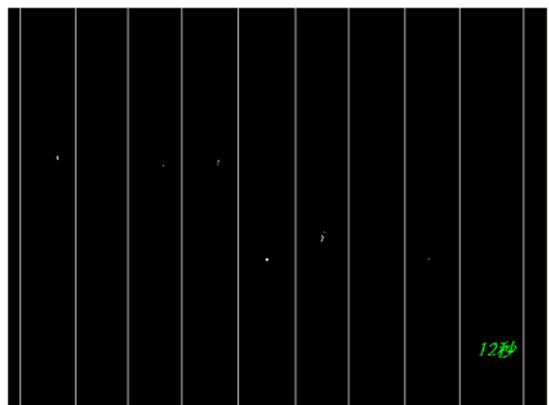
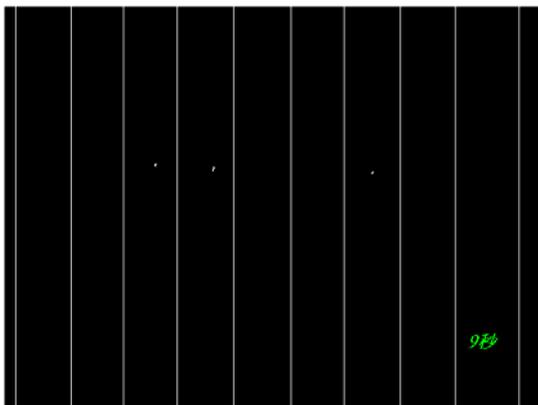
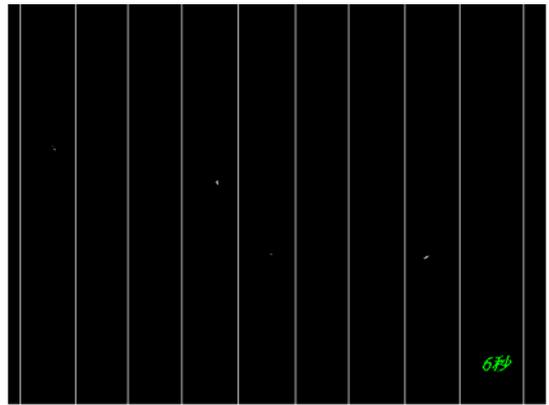
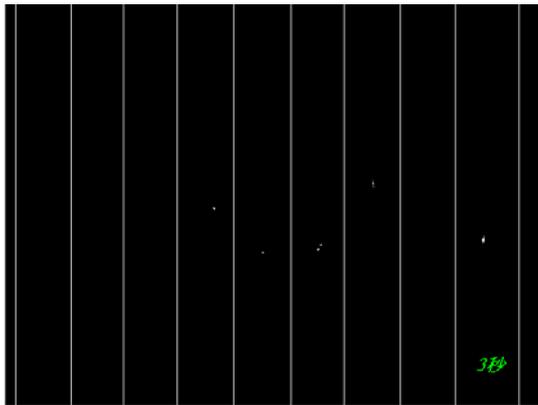
圖[4-8](C) 結果

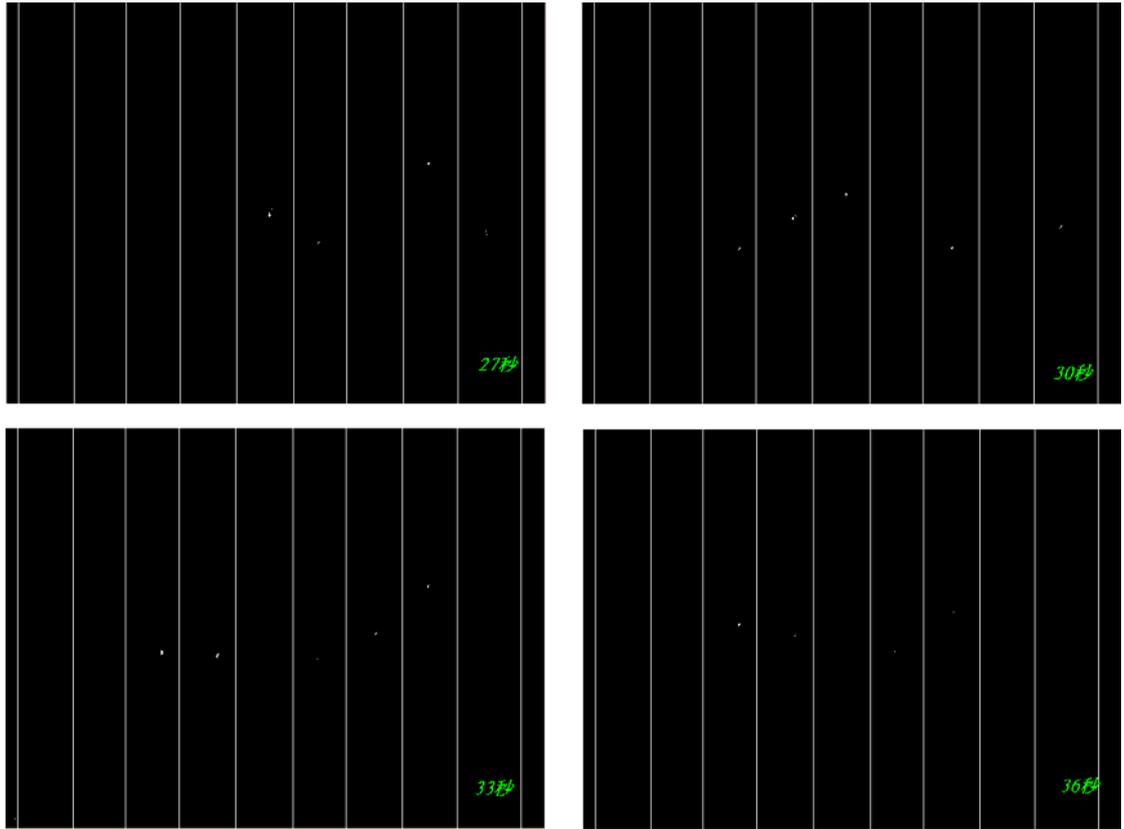
二、夜間偵測結果如圖[4-9](A)、(B)、(C)





圖[4-9](A) 晚上擷取連續影像 12 張





圖[4-9](B) 閾值取 28



FlySleepTime - 記事本

檔案(F) 編輯(E) 格式(O)

0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	1	0	1
1	0	0	1	1	0	0	1	0
0	0	1	1	0	0	1	0	0
1	0	1	1	1	1	0	1	0
0	0	0	0	0	1	1	0	0
1	0	1	1	1	1	1	0	0
1	0	1	1	0	0	1	1	0
1	0	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	1	1	0	1	1
0	0	1	1	1	0	1	0	1
0	0	1	1	0	1	1	1	0
0	0	1	1	0	1	1	0	0
0	0	1	1	0	1	0	1	0
0	0	1	1	1	1	1	1	0

圖[4-9](C) 結果

白天跟夜間偵測結果比較，白天影像較清晰，果蠅稍微移動或轉動就可以比較清晰，所以影像處理後較明顯，夜間偵測影像比較模糊，不過還是可以偵測果蠅是否有移動，所以用 Camera 偵測果蠅睡覺實驗是可行的。

Camera 偵測實驗與 Behavioral Analysis 實驗差異處如下表：

Camera 偵測實驗	Behavioral Analysis 實驗
主動偵測	被動偵測
利用影像處理法偵測	利用紅外線偵測
能偵測到全部區域	只能偵測中間
可有影像資料	無
有 Active time 以及 Sleep time 資料	只有 Sleep time 資料
可模擬被動偵測法	無
可觀察移動軌跡	不能
偵測資料更為詳細	只能有中間區域偵測資料

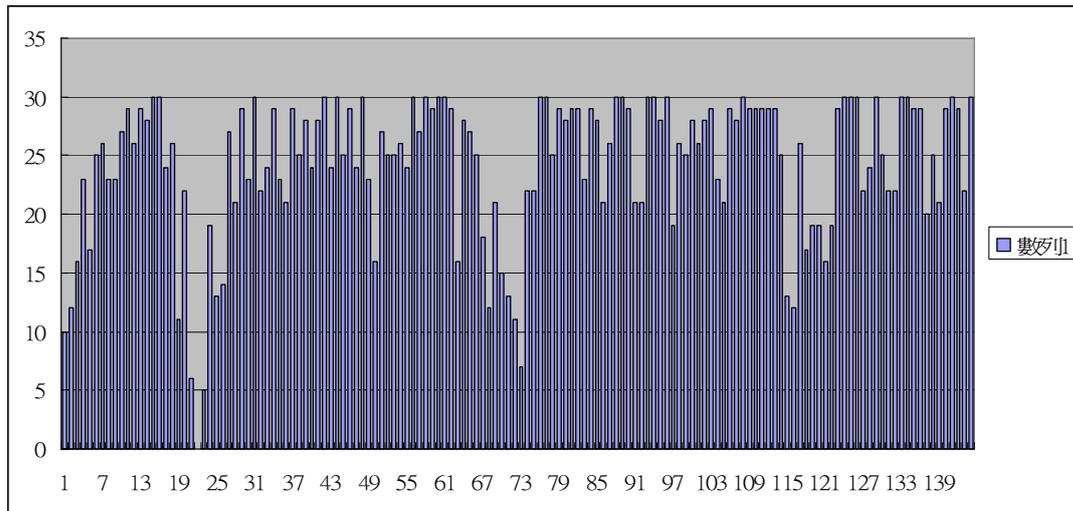
果蠅統計資料:

13 隻果蠅，3 天的統計資料如下表，平均值皆取到小數點第 2 位

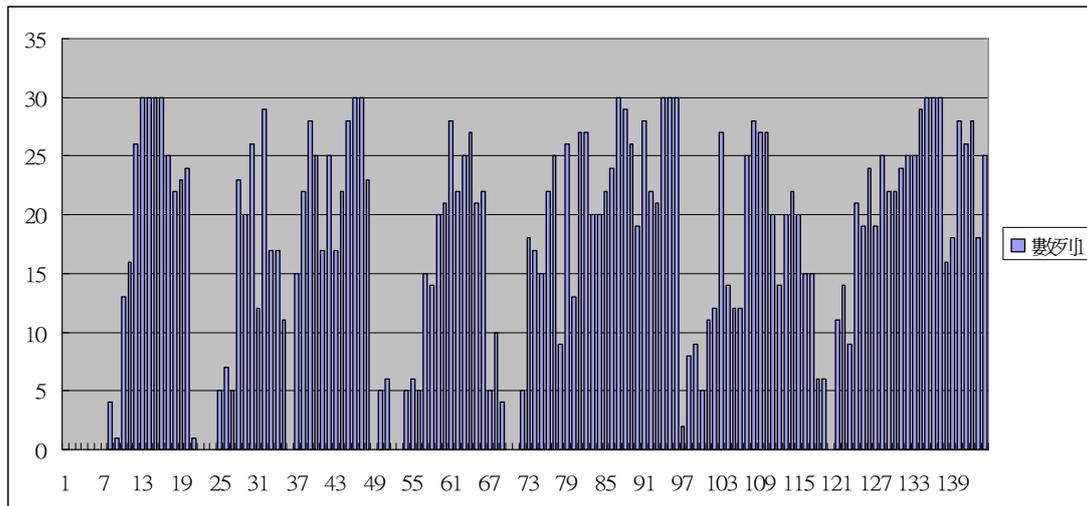
果蠅編號	Total 睡眠次數	白天睡眠次數	晚上睡眠次數	平均一次睡眠時間	白天平均睡眠時間	晚上平均睡眠時間	總共睡眠時間	白天總共睡眠時間	晚上總共睡眠時間	CI 值
1	199	114	85	17.59	14.29	21.81	3484	1630	1854	25.77
2	193	74	119	12.70	12.10	12.97	2440	896	1544	22.75
3	82	42	40	39.21	33.07	45.67	3216	1389	1827	27.40
4	104	52	52	26.98	20.96	33	2806	1090	1716	26.40
5	132	53	79	28.12	33.88	23.91	3685	1796	1889	27.06
6	126	49	77	20.23	21.04	19.71	2549	1031	1518	24.65
7	75	41	34	42.59	28.04	58.88	3152	1150	2002	27.87
8	185	97	88	18.11	15.03	21.52	3352	1458	1894	25.45
9	74	48	26	44.60	26.77	75.80	3256	1285	1971	27.44
10	98	52	46	35.39	28.71	42.17	3433	1493	1940	27.19
11	69	59	10	54.13	27.10	208.2	3681	1599	2082	28.13
12	97	52	45	30.03	18.25	42.97	2883	949	1934	26.40
13	160	82	78	22.08	19.43	24.57	3511	1594	1917	26.27

每 30 分睡眠時間表格如下頁:

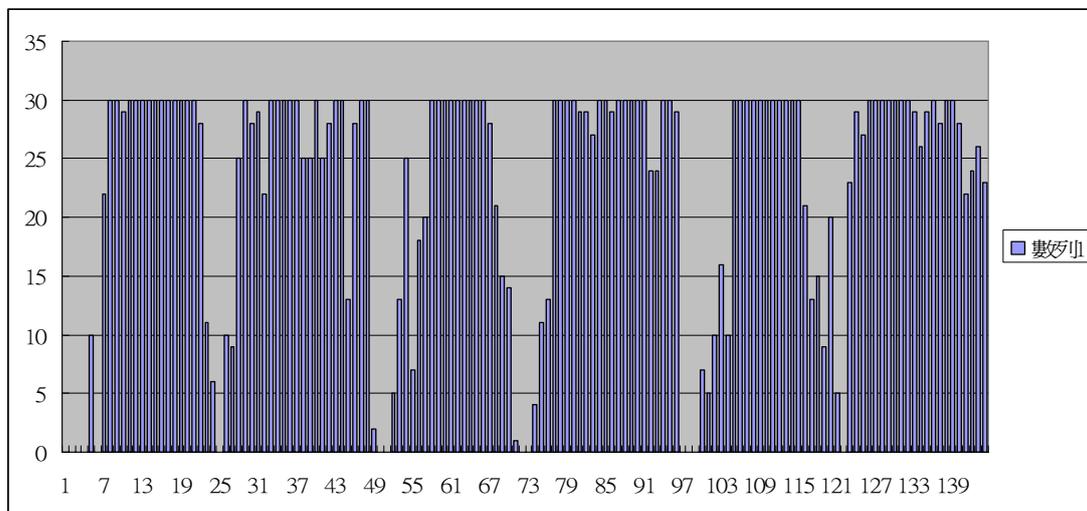
果蠅編號1



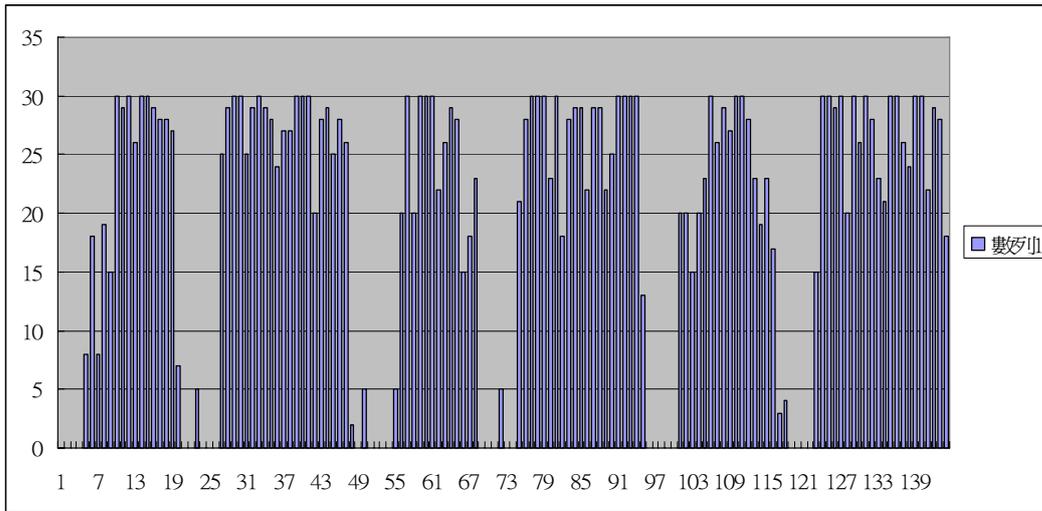
果蠅編號2



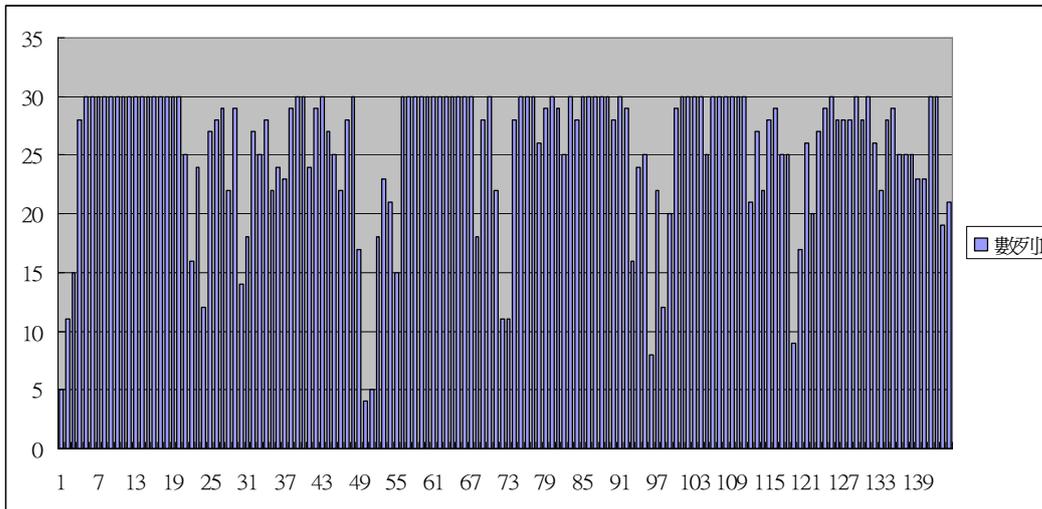
果蠅編號3



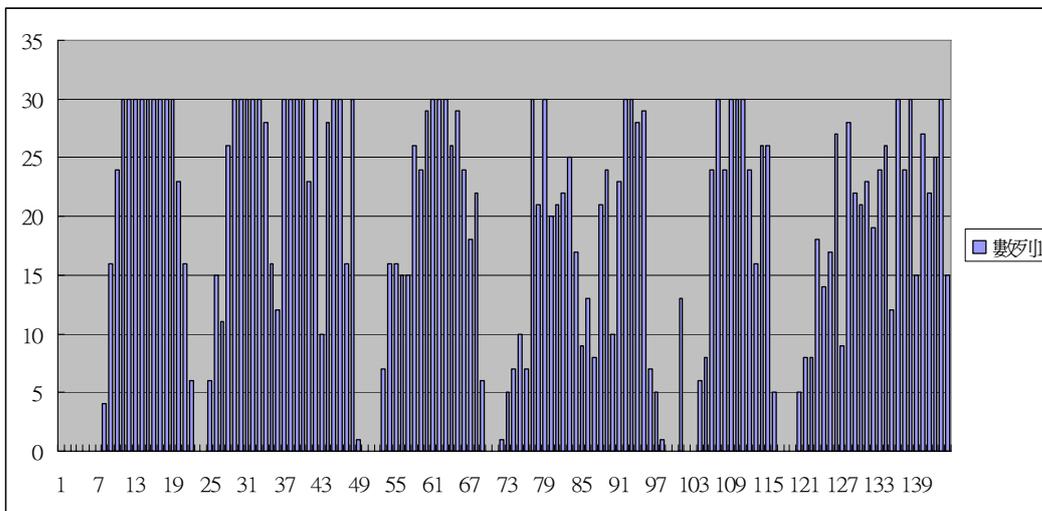
果蠅編號4



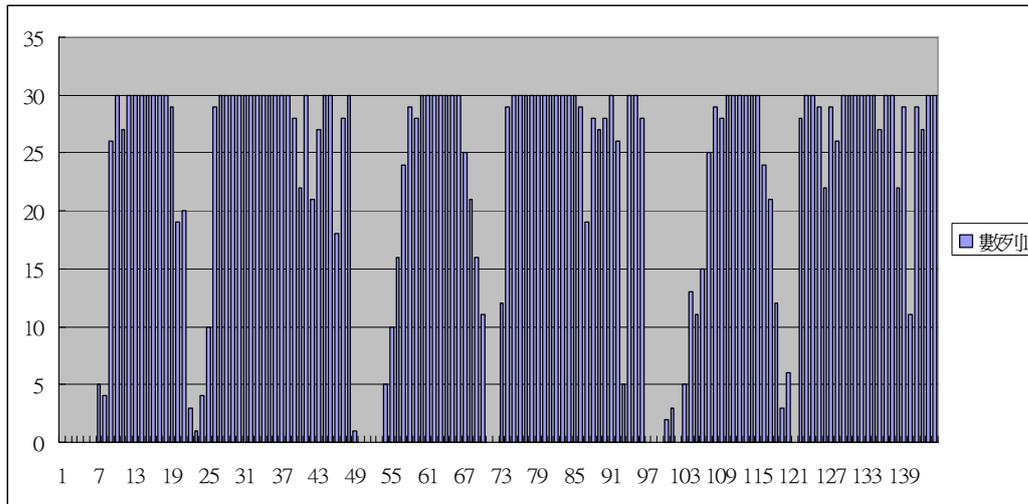
果蠅編號5



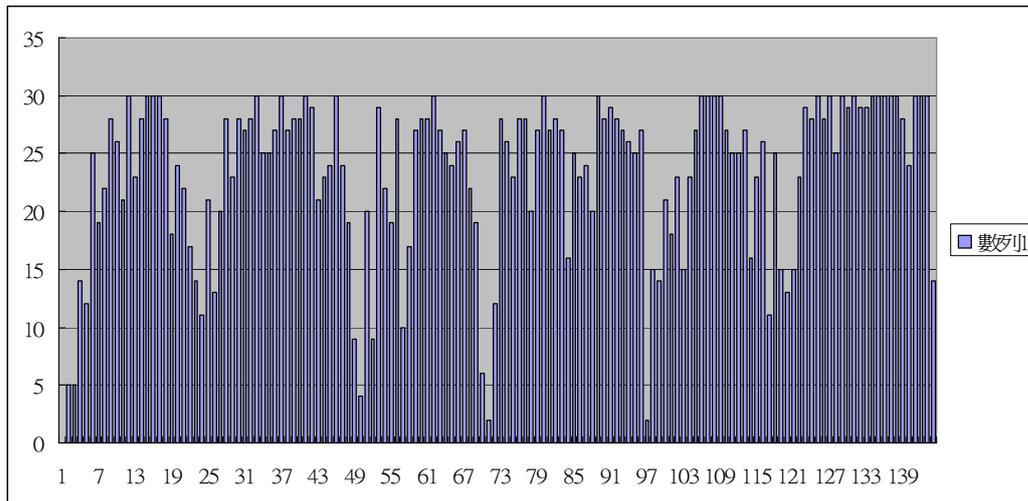
果蠅編號6



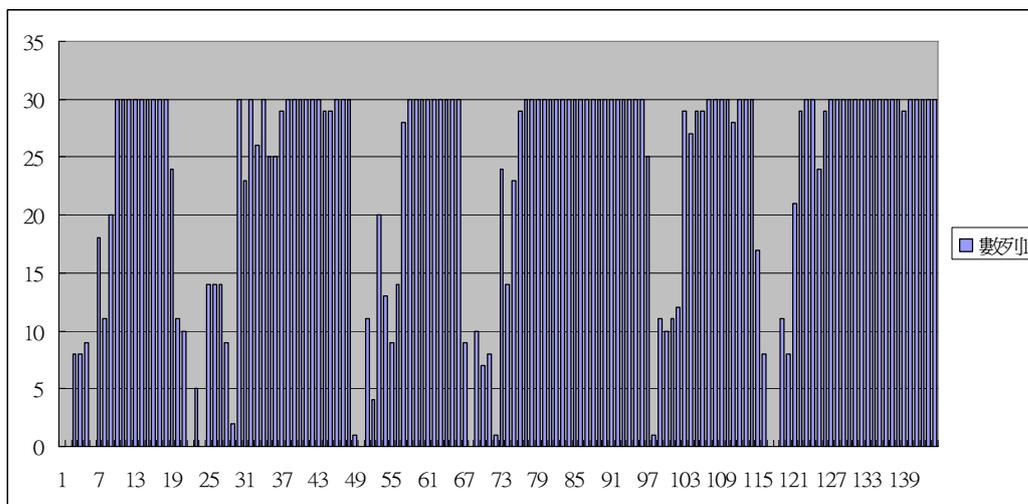
果蠅編號7



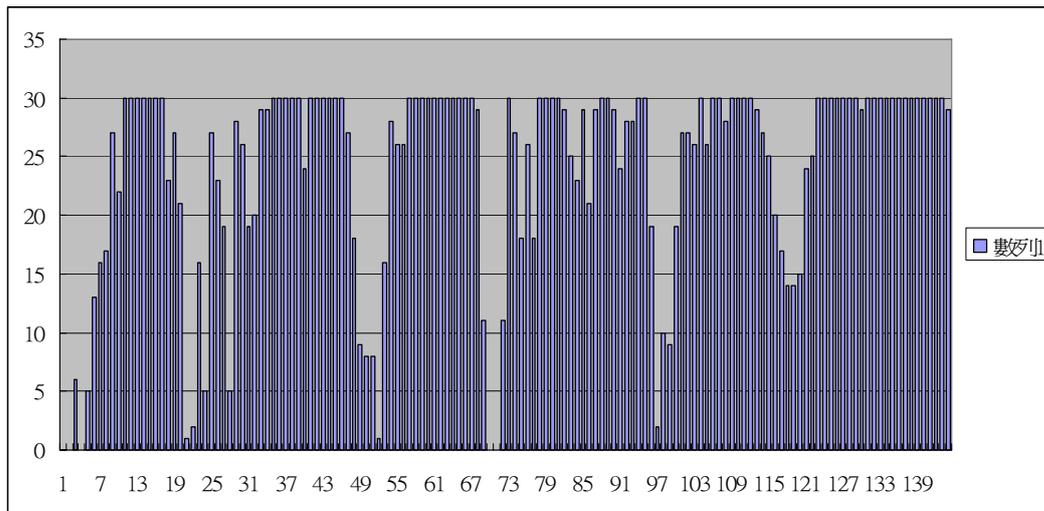
果蠅編號8



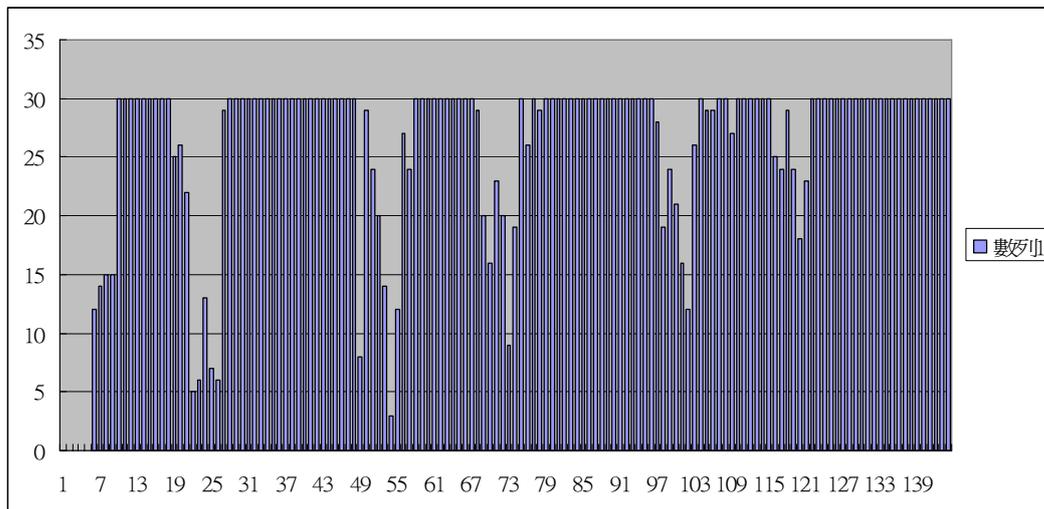
果蠅編號9



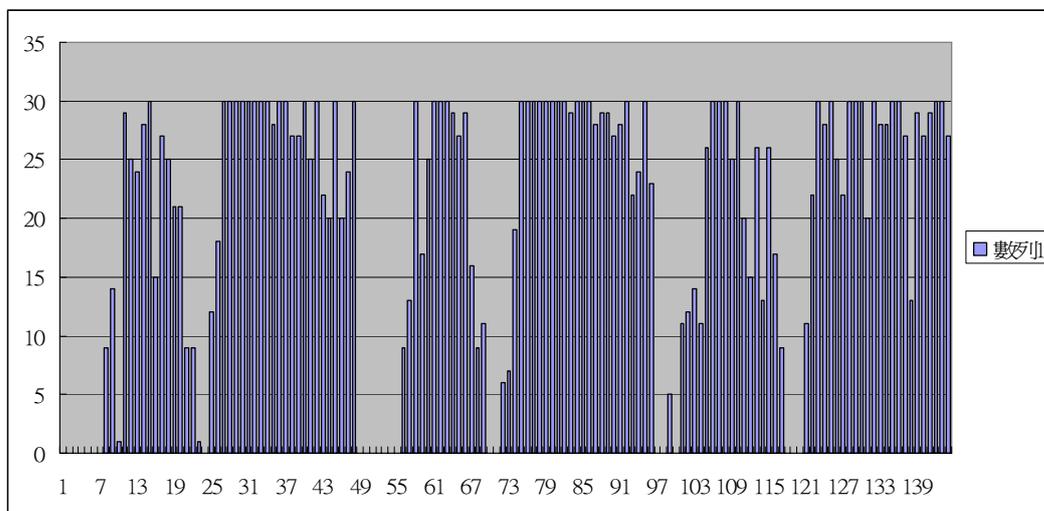
果蠅編號10



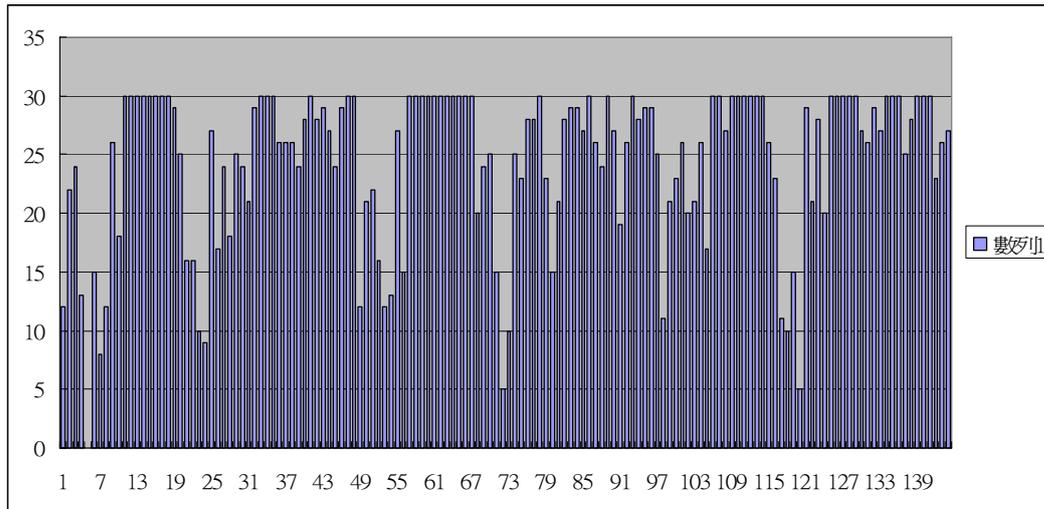
果蠅編號11



果蠅編號12



果蠅編號13



白天:1~24、49~72、97~120

晚上:25~48、73~96、121~144

下圖表格為以上果蠅資料的平均值跟標準差

	Total 睡眠次 數	白天 睡眠 次數	晚上 睡眠 次數	平均 一次 睡眠 時間	白天 平均 睡眠 時間	晚上 平均 睡眠 時間	總共睡 眠時間	白天總 共睡眠 時間	晚上總 共睡眠 時間	CI 值
平均值	122.61	62.69	59.92	30.13	22.97	48.55	3188.3	1335.3	1852.9	26.37
標準差	13.141	6.234	8.428	3.427	1.977	14.18	112.728	80.471	46.473	0.408

結論:

由以上圖表可發現果蠅睡眠時間晚上比白天多，由以上數據可以研究許多果蠅睡眠行為，例如 CI 值可觀察果蠅熟睡程度等，經過本論文實驗所得到資訊更能增加果蠅睡眠資料準確度。

第五章 結論與未來展望

本實驗提供一個更準確的果蠅活動偵測方法，為主動偵測方法，解決被動偵測可能忽略果蠅活動資訊，進而誤判為睡眠的錯誤資訊，以及提供其果蠅活動資料，本研究更能改善被動偵測缺點並準確獲得果蠅活動資料，使得以後對果蠅睡眠研究統計數據更為完整，有助於觀察果蠅睡覺實驗，進而希望替果蠅睡眠實驗提供更準確的資料獲取平台，方便觀測果蠅睡覺行為。

未來希望可以藉由電腦視覺實驗能夠獲得果蠅各種行為的更多資訊，使得對果蠅研究能有更全面的了解。



參考文獻

- [1] C. Cirelli, “Searching for sleep mutants of *Drosophila melanogaster*,” BioEssays 25, pp.940–949, 2003
- [2] J. C. Hendricks, S. M. Finn, K. A. Panckeri, J. Chavkin, J. A. Williams, A. Sehgal, and A. I. Pack, “Rest in *Drosophila* Is a Sleep-like State,” Neuron, Vol. 25, pp.129–138, January, 2000
- [3] K. S. Ho, A. Sehgal, “*Drosophila melanogaster*: An Insect Model for Fundamental Studies of Sleep,” Methods in enzymology, VOL. 393, pp.772-793, 2005
- [4] Q. Yuan, W. J. Joiner, and A. Sehgal, “A Sleep-Promoting Role for the *Drosophila* Serotonin Receptor 1A,” Current Biology 16, pp.1051–1062, June 6, 2006
- [5] R. C. Gonzalez and R. E. Woods, “Digital Image Processing,” Addison-Wesley Publishing Company, 1993
- [6] W. Liu, F. Guo, B. Lu, A. Guo, “*amnesiac* regulates sleep onset and maintenance in *Drosophila melanogaster*,” Biochemical and Biophysical Research Communications, No. of Pages 6, May 2008

附 錄

果蠅成長階段可分以下幾個時期:

- i. Egg 在果蠅培養基(medium)表面一天
- ii. Level 1 第一次蛻皮後，在培養基質表面進食一天
- iii. Level 2 第二次蛻皮後，在於基質上下蠕動一天
- iv. Level 3 同上三天
- v. Pupa 蛹期，靜止於瓶壁五天
- vi. Imago 羽化後等待期外骨骼與翅膀乾燥硬化 1~3 小時
- vii. Adult 成蟲，飛翔活動 30~50 天



實驗環境及器材

果蠅培養環境首先把果蠅養在培養瓶(牛奶瓶)中，培養瓶需高溫高壓滅菌，果蠅其主要食物(培養基)調配如下(以下調配份量可供 21 培養瓶使用):

- I. 所需主料: 玉米粉粒(50 克)、洋菜(10 克)、紅糖(20 克)、乾燥酵母粉(15 克)以及水。
- II. 防腐劑: Propionic acid(2.5ml)、1% Benzyl benzoate in 95% Ethanol(2.5ml)。

調配方式:

將主料(玉米粉粒、洋菜、紅糖、乾燥酵母粉、水)到入適當容器

內，均勻攪拌後用電鍋悶煮，煮熟後悶 20 至 30 分取出涼置，當其溫度冷卻至約 70 度時加入防腐劑充分攪拌後分裝置培養瓶中，每瓶約一公分高即可，最後放在室內約 3 天即可使用，注意要瓶內水氣乾燥才可以使用。

注意事項:

為避免培養基被汙染或感染細菌，培養瓶口勿沾培養基，應保持清潔避免培養基接觸外面細菌汙染，要用乾淨的棉花塞住瓶口，要保持棉花清潔，避免培養基被棉花所汙染。可使用抗生素來避免培養基感染細菌，使用方法是當調配時與防腐劑同時加入充分攪拌，抗生素不宜多用，可使用 0.1% 四環黴素(tetracycline)，使用過多會影響果蠅生長。

果蠅操作、雌雄分辨、計數方法

為了要分辨果蠅性別或計數，所以要使果蠅暫時昏迷以便操作。使果蠅昏迷方法有很多種，以下介紹常見三種:



一、將果蠅放在試驗管內，放在冰塊內 10 分鐘，注意事項是放約一分鐘以上果蠅會慢慢不會動，此時是假暈狀態，這時不可心急就操作，不然會全部飛走，一定要耐心等 10 分鐘。

二、可以用麻醉法(乙醚)使果蠅昏迷，方法是準備一瓶麻醉瓶，瓶口用軟木塞或橡皮塞，然後在軟木塞(或橡皮塞)上用圖釘或釘子釘上一團棉花球，將棉花球吸收乙醚，再來將果蠅倒入麻醉瓶中蓋上裝有乙醚的瓶蓋朝內，最後將麻醉瓶反放，約一分鐘後果蠅都昏迷在瓶內，即可取出操作，注意事項是乙醚不可過多(避免有乙醚液體在瓶內)以免過度麻醉而死亡，還有操作過程中，果蠅可能會甦醒，此時準備一玻璃培養皿，內用膠帶把棉花球貼上，滴上適

量乙醚然後蓋著以免乙醚全數揮發，當果蠅快甦醒時，在蓋上培養皿使其麻醉，以方便操作。

三、用二氧化碳(CO₂)麻醉，確定果蠅全數量倒即可。

簡易果蠅計數方法及雌雄分辨，先準備一張正方形白紙，沿對角線對折然後攤平放至桌面上，將昏迷果蠅放到對角折痕上，用小毛筆(水彩筆等)或羽毛針等工具將果蠅均勻分散在對角折痕上將雌雄分類一一分類計數撥入各側。簡單分辨雌雄大約幾點為母果蠅尾端是尖的，公果蠅尾端是平的，而且其性器官特稱很明顯，與人類完全相反。或是用體型分辨，將果蠅均勻放在對角折痕上其母果蠅體型明顯比公果蠅大，且成年的公果蠅尾端是黑色的，所以簡易雌雄分辨應該不難且快速，不然要藉助顯微鏡來觀察果蠅的性向特徵，這比較費時費工，跟實驗成本效益不合，故不採用。

