

文章编号: 1671-7848(2007)03-0340-03

面向 PCR 微流控芯片的多通道温控系统

刘 勋¹, 姚李英¹, 张印春², 陈 涛¹, 左铁钊¹

(1. 北京工业大学 激光工程研究院, 北京 100022;

2. 北京工业大学 电子信息与控制工程学院, 北京 100022)



摘 要: 基于 PCR 微流控芯片, 研究和设计了一套多通道温度控制系统, 实现了温控功能并应用于 PCR 扩增试验。系统由硬件电路搭建和控制软件编写共同实现。温度信号由 AD590 采集, 经过 CD4051 选通, 由 TLC0832 将模拟信号转换为数字信号, 传送给 AT89C2051。单片机根据负反馈算法对信号进行处理, 得到控制指令, 经过 TLC5620 得到模拟信号, 控制驱动电路。利用汇编语言编写功能软件, 包括 A/D, D/A 转换程序、跳转程序和系统闭环程序。通过自主设计的硬件电路和控制软件, 实现了微型 PCR 微流控芯片的多通道温度控制系统。实验结果表明, 系统符合 PCR 扩增原理的要求, 升温迅速, 控温准确, 可用于 PCR 扩增试验。

关键词: PCR 微流控芯片; 温度控制; 负反馈; 单片机

中图分类号: TP 27

文献标识码: A

Temperature-controlled System with Multicenter Based on PCR Biochip

LIU Xun¹, YAO Li-ying¹, ZHANG Yin-chun², CHEN Tao¹, ZUO Tie-chuan¹

(1. College of Laser Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China;

2. College of Electronic Information & Control Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China)

Abstract: A temperature-controlled system with multichannel of PCR biochips is designed for achieving the function of temperature control and applying in the PCR experiment. The hardware and the software actualize the system function. Temperature signals are collected by AD590, and then are selected by CD4051. The analog signal is transferred to the digital signal by TLC0832 and transmitted to AT89C2051. Microcontroller treats the signals and implements temperature control, according to negative feedback algorithm. TLC5620 is used to change the control command to analog signal, and then control the drive part. The assembly language is used to write the A/D conversion, D/A conversion and closed loop program. The experimental results show that the system meets the requirements of PCR principle. It is accurate and the rise/fall rates of temperature are rapid.

Key words: PCR chips; temperature control; negative feedback; microcontroller

1 引言

PCR 是聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction)的简称, 是一项在短时间内体外大量扩增特定的 DNA 片段的分子生物学技术。目前, 已经成为生命科学研究与应用领域中一种应用广泛、十分重要的技术, 被广泛应用于需要基因克隆和制造突变的各个领域^[1,2]。

PCR 微流控芯片是第三代 PCR 技术, 该技术将模板 DNA、引物、Tag 酶、缓冲液按照先后顺序加入在芯片状固体支持物上加工的微反应槽, 混合均匀; 然后让 PCR 混合物重复通过芯片上的三个恒温区域(变性区 Melting(94 °C), 退火区 Annealing(55 °C), 扩增区 Extension(72 °C)), 从而实现 DNA

的变性、退火和扩增。三个温区温度的控制是完成 PCR 扩增的关键因素。本文设计一个可以对三个温区进行独立设置和控制的高精度、微型化的温度控制系统^[3~5]。

2 硬件部分

1) 整体控制结构 该系统选择价格便宜、线性度好的 AD590 作为温敏元件, 用运算放大器对电流信号进行放大, 得到的电压输出范围为 0~5 V, 对应的温度范围为 0~100 °C。应用 A/D 转换芯片, 将三路信号依次输入到 2051 芯片, 通过和设定的温度进行比较, 将数字信号通过 D/A 转换芯片输出到各自对应的驱动电路, 通过控制驱动电路, 实现对电热膜加热的控制。

收稿日期: 2006-05-12; 收修定稿日期: 2006-05-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50175002); 北京市自然科学基金资助项目(3031001); 国家自然科学基金重点资助项目(50335050)

作者简介: 刘 勋(1982-), 男, 北京人, 研究生, 主要研究方向为激光微技术等; 左铁钊(1941-), 女, 教授, 博士生导师。

面向 PCR 微流控芯片的多通道温控系统，如图 1 所示。

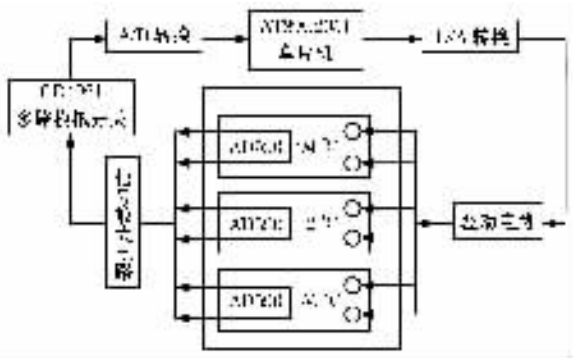


图 1 面向 PCR 芯片的多通道温控系统
Fig.1 Temperature-controlled system with multicenter based on PCR biochip

2) 温度采集及信号变送模块 本系统的温度采集及信号放大电路由 AD590 和 OP07 集成运算放大器组成。AD590 是一个感温电流源，利用 PN 结正向电流与温度的关系而构成的电流输出型温度敏感器。AD590 作为一种温度电流的变换元件，具有 $1 \mu\text{A}/\text{K}$ 的温度系数，在 $0 \text{ }^\circ\text{C}$ 时电流为 $273 \mu\text{A}$ ，而 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (298.2 K) 时，输出电流为 $298.2 \mu\text{A}$ ；测量范围是 $-55 \sim 150 \text{ }^\circ\text{C}$ ，测温精度 $\pm 0.3 \%$ 的非线性。信号采集及放大电路，如图 2 所示。

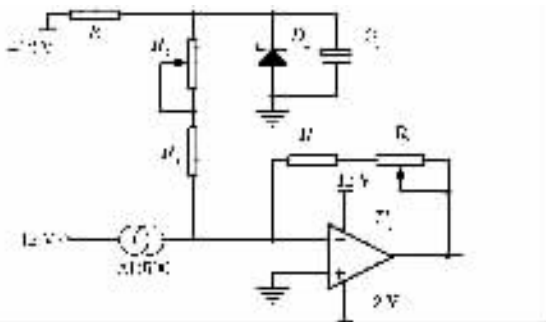


图 2 信号采集及放大电路

Fig.2 Circuit diagram of signal collecting and amplification

在 $0 \text{ }^\circ\text{C}$ 时调整电阻 R_3 ，使得通过电阻 R_3 和 R_5 的电流为 $273 \mu\text{A}$ ，和 AD590 在 $0 \text{ }^\circ\text{C}$ 时输出电流 $-273 \mu\text{A}$ 相抵消，这样运算放大器的输出为 0 V 。在 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 时，AD590 输出电流为 $-373 \mu\text{A}$ ，此时，运算放大器的输入电流为 $-100 \mu\text{A}$ ，调整 R_4 使运算放大器的输出电压为 $+5 \text{ V}$ 。为了得到稳定的电流值，电阻 R 应使用温度系数小的精密电阻并且使用 $+5 \text{ V}$ 稳压管以稳定输入电压。

3) 多路模拟开关和 A/D 转换 温度传感器采集的温度信号经集成运算放大器后，得到和温度相关的电压信号，经过多路模拟开关区分出不同的输入信号，并经过 A/D 转换后，由 2051 芯片进行处理。系统采用的多路模拟开关为 CD4051，它是常用的八选一模拟开关，具有双向传输性能。CD4051

的引脚 X3 ~ X7, INH, GND, VEE, C 接地；VDD 接 $+12 \text{ V}$ 电源；A, B 控制端接 2051 单片机的 P1.6 和 P1.7 端口；3 接 TLC0832 型 A/D 转换芯片的引脚 3。TLC0832 是一个 8 引脚的 A/D 转换芯片，各引脚接线方式为：CH0, DI 和 GND 接地；VCC 接 $+5 \text{ V}$ 的电源；CH1 接输入信号；DO, CLK, CS 分别接 2051 芯片的 P1.5, P1.4 和 P1.3^[6]。

4) D/A 转换电路 本系统中 D/A 转换的功能通过 TLC5620 芯片完成。它是一个 4 通道、8 位串行通信的 D/A 转换芯片。该芯片输入时钟由单片机的串行通讯接口 P3.4 给出，上升沿读取数据，每组数据由 14 个时钟周期组成。TLC5620 芯片的脚 13 (LDAC) 接地，使其失去控制功能，这样它的输出信号只由脚 8 (LOAD) 进行控制，下降沿输出数据。TLC5620 芯片的通道选择由串行输入信号的第 4 位和第 5 位控制。将 TLC5620 芯片的参考电压都设置为 $+5 \text{ V}$ ，其 D/A 转换公式为

$$V = REF * CODE * (1 + RNG) / 256$$

式中，REF 为参考电压值；CODE 为由 8 位二进制码转换后得到的数值，取值范围为 $0 \sim 255$ ；RNG 在串行控制字符中定义，取值为 0 或 1。

5) AT89C2051 单片机 系统采用的单片机 AT89C2051 带有 2 K 字节的 EPROM，128 字节的 RAM，15 根 I/O 线，2 个 16 位定时/计数器，5 个向量 2 级的中断结构，一个全双向串行接口，一个精密的模拟比较器，片内振荡器和时钟电路。

AT89C2051 的接线方式为：VCC 接 $+5 \text{ V}$ 的工作电源；GND 接地；RST 作为复位信号输入端，外面通过 $10 \mu\text{F}$ 的电容和 $+5 \text{ V}$ 的电源相接；P1.7, P1.6 和 CD4051 的 A 和 B 控制输入(输出)端相连；P1.5, P1.4 和 P1.3 分别和 TLC0832 的 DO, CLK, CS 相接；XTAL1, XTAL2 和时钟发生器相接，外接的晶振频率为 $11.059 2 \text{ MHz}$ ；P1.2, P3.4, P3.5 分别和 TLC5620 的 LOAD, CLK, DATA 端口相接^[7]。AT89C2051 把输入的数字信号和设定温度值比较，当输入温度小于设定温度时，AT89C2051 将输出 FFH 到 TLC5620。由于 FFH 大于 80H，所以 TLC5620 的输出为最大值 $+5 \text{ V}$ ，TLC5620 将工作在饱和状态。

6) 驱动电路 本系统采用的驱动电路是由两片集成运算放大器所构成的，放大倍数为 2.4 的正向电压放大电路，由中功率 NPN 型三极管组成的共集放大电路提供电流放大输出。驱动电路的设计取决于电热膜的额定工作电压和电流，本系统中电热膜的额定工作电压为 12 V ，额定工作电流为 1.5 A ，使用的寿命为 $5 000 \sim 10 000 \text{ h}$ 。电薄膜加热元件有体积小、重量轻、热响应时间快等优势，适应了微型化的要求。

3 系统软件设计

1) A/D 和 D/A 子程序 A/D 转换使用 8 位串行 A/D 转换芯片 TLC0832, 由单片机提供时钟信号并根据其时序读取相应的数据。首先将片选 P1.4 清零, 打开 TLC0832 的片选, 等待一个周期; 随后的两个周期输入通道选择信号; 等待一个周期, 输入 8 位数据, 使用 MOV 指令将数据读入到寄存器 C; 再按次序存入到某一位寻址的存储器中, 关闭片选, 一个 A/D 的信号读取工作完成^[8]。

D/A 转换使用 TLC5620 芯片, 首先置位 LOAD, 然后输出 2 位通道选择信号, 并为 RNG 赋值, 根据实际需要 TLC5620 的输入口置位或者清零, 这样 TLC5620 芯片读入的数据为 FFH 或者 00H。经过 8 个周期, 向 LOAD 加载负脉冲信号, 开启电压输出。输出信号为 0 V 或者 +5 V, D/A 转换完毕。

2) 判断转移子程序 判断转移程序首先设定需要达到的温度值, 然后调用 A/D 程序将数据读入单片机中, 与设定的温度值作有符号数减法, 随后使用 JNC 指令判断寄存器 C 的值, 根据 C 的值控制加热器的工作情况^[9]。

3) 闭环程序 它是子程序的综合, 也是整个系统能否正常工作的关键, 其流程如图 3 所示。

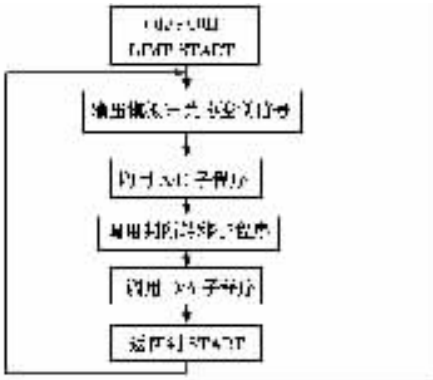


图 3 闭环程序流程图

Fig.3 Flow chart of closed loop program

程序从 00H 开始执行, 用 LJMP 指令跳转到主程序所在地址, 由单片机输出控制信号控制多路模拟开关来选择不同的温度采集点的信号, 再调用 A/D 程序将采集的温度值读入到单片机内部, 进一步调用判断转移程序和 D/A 子程序, 最后用 LJMP 指令跳转到程序的开始处, 以实现负反馈控制。

4 实验结果

在室温下(25 °C), 第一温区在 180 s 时达到 54.6 °C, 并趋于稳定; 第二温区在 250 s 时达到 71.9 °C, 并且保持稳定; 第三温区在 290 s 时达到 93.8 °C, 保持稳定。相邻温度区域间的温差分别约为 22 °C 和 17 °C, 符合 PCR 扩增原理的要求。

经过实验得到的 PCR 微流控芯片的温控曲线, 如图 4 所示。

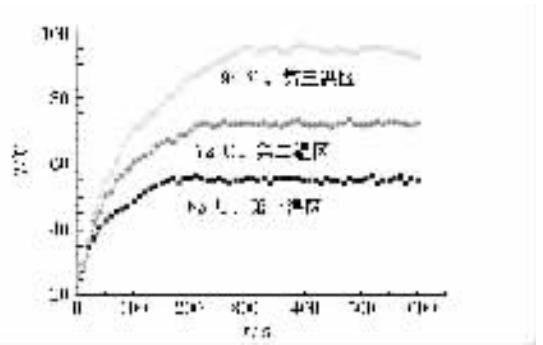


图 4 PCR 微流控芯片温控曲线

Fig.4 Temperature-controlled curve of PCR biochip

5 结 语

按 PCR 微流控芯片对 DNA 进行扩增的原理, 提出了温控系统的总体设计方案, 设计了一套可实现对三个温区的独立设置和控制的系统, 温度控制精度为 ±0.3 °C。选择 AD590 作为温敏元件, 选用 OP07 放大器对电流信号进行放大, 应用 TLC0832 芯片, 将三路信号依次输入到 AT89C2051 单片机, 通过和设定的温度进行比较, 得到控制信号, TLC5620 将其输出到各自对应的驱动电路, 通过控制驱动电路的开关, 实现对电热膜的加热或停止加热。

本文研制实现的微型 PCR 微流控芯片温度控制系统, 符合 PCR 扩增原理的要求, 具有升温迅速、控温准确等特点, 可应用于 PCR 扩增实验。

参考文献 (References):

[1] Kopp M U, Mello A J, Manz A, et al. Chemical amplification continuous-flow PCR on a chip[J]. Science, 1998, 280(5366): 1046-1048.

[2] Fukuba T, Yamamoto T, Naganuma T, et al. Microfabricated flow-through device for DNA amplification-towards in situ gene analysis[J]. Chemical Engineering Journal, 2004(101): 151-156.

[3] Zhang Q T, Wang W H, Zhang H S, et al. Temperature analysis of continuous-flow micro-PCR based on FEA[J]. Sensors and Actuators B, 2002(82): 75-81.

[4] Sun K, Yamaguchi A, Ishida Y, et al. A heater-integrated transparent microchannel chip for continuous-flow PCR[J]. Sensors and Actuators B, 2002(84): 283-289.

[5] Yoon D S, Lee Y S, Lee Y S, et al. Precise temperature control and rapid thermal cycling in a micromachined DNA polymerase chain reaction chip[J]. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2002(12): 813-823.

[6] 徐凯. 串行模数转换器 TLC0832 在电力参数采集中的应用[J]. 仪表技术, 2002(3): 22-23. (Xu Kai. The application of TLC0832 serial A/D converter in the data-acquisition of power[J]. Instrumentation Technology, 2002(3): 22-23.)

[7] 王幸之, 钟爱琴, 王雷. AT89 系列单片机原理与接口技术[M]. 北京: 北京航空航天大学出版社, 2004. (Wang Xingzhi, Zhong Aiqin, Wang Lei. AT89 series SCM and interface technology[M]. Beijing: Beihang University Press, 2004.)

[8] 胡汉才. 单片机原理及其接口技术(第二版)[M]. 北京: 清华大学出版社, 2004. (Hu Hancan. SCM principle and its interface technology(Second Edition)[M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2004.)

[9] 孙育才. MCS-51 系列单片微型计算机及其应用(第三版)[M]. 南京: 东南大学出版社, 2000. (Sun Yucai. MCS-51 series SCM and its application(Third Edition)[M]. Nanjing: Dongnan University Press, 2000.)