

基于磁分离的高通量核酸检测工作站 控制系统设计

万遂人¹,程 铅¹,何农跃¹,刘 宾²

1. 东南大学生物科学与医学工程学院,南京 210096
2. 南京医科大学基础医学院生物医学工程系,南京 210029

摘要 核酸检测工作站主要是由光、机、电等部分构成的高精度生化分析仪器,其功能模块主要有:高通量磁分离系统、微量移液系统、精确温控系统、荧光信号检测系统。根据以上系统应用要求,简要介绍了系统硬件框架。基于硬件基础,系统软件采用树形控件完成了实验流程设计;采用 MFC 绘图完成了美观、易操作的实验属性设置和工作台布局设置,采用多线程监控技术实现与下位机 RSC-485 串口通信;采用 Access 数据库保存实验流程及结果,并导出打印实验数据等。

关键词 核酸分析系统;磁分离;串口通信;数据库编程

中图分类号 TP3

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2013.13.008

Control System of High-throughput Nucleic Acid Detection Workstations Based on Magnetic Separation

WAN Suiren¹, CHENG Qian¹, HE Nongyue¹, LIU Bin²

1. School of Biological Science & Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China
2. School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract The nucleic acid detection workstation is a high-precision biochemical analytical instrument composed of optical, mechanical, electrical and other components. There are four functional modules in the workstation, including the high throughput magnetic separation system, the micro-volume pipetting system, the accurate temperature control system and the fluorescent signal detection system. According to the requirements of the above systems, a brief introduction is given for the framework of the hardware system. Based on the hardware functions, the software system completes the design of the experimental process using the tree control: an easy to use and good looking experimental property setting interface and a workbench layout with the MFC drawing. Serial communications are carried out through the slave PC's RSC-485 port with multi-threaded monitoring technologies: saving the experimental processes and results, exporting experimental data with the access database programming for their printing.

Keywords nucleic acid analysis system; magnetic separation; serial communication; database programming

0 引言

对人类遗传信息的研究内容主要集中在测定 DNA 序列^[1]、解释遗传信息等研究层面,随着人类基因组计划(Human Genome Project,HGP)的完成,为了从 DNA 水平更好地研究和保护生命体,对人类遗传信息的研究开始转移到从分子水

平对生物学功能进行研究的层面。当今医疗条件下,在快速诊断严重危害生命健康的重大疾病及大规模突发传染病中,研究者需要对基因突变位点进行多位点多样本的多个分型研究^[2],甚至要对来自病人和对照样本上的多个样本的多个位点进行分型研究,这是一项费时又费力的工作,因此

收稿日期:2013-01-11;修回日期:2013-02-26

基金项目:国家自然科学基金项目(60927001);国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2007AA022007);国家重大科学研究计划项目(2010CB933903);国家科技重大专项(2009ZX10004-311);江苏省科技支撑计划项目(BE2009147)

作者简介:万遂人,教授,研究方向为医学电子学与生物医学仪器,电子信箱:srwan@seu.edu.cn;刘宾(通信作者),讲师,研究方向医学电子学与电子医疗仪器,电子信箱:sslb_112@hotmail.com

迫切需要研制出适合于临床应用且可进行快速、高效、多样本、多位点、高通量的核酸检测平台。本系统的核心检测方法为单碱基差异检测,在高通量磁分离技术、精确温控技术、微量加样技术和高精度荧光信号检测技术等硬件平台基础上,构建基于磁分离的高通量核酸检测系统,并将该系统应用于单核苷酸多态性分型^[9]研究。本文主要完成核酸检测系统中控制系统的构架^[4]和实施。

1 硬件控制系统

1.1 检测系统工作原理

本系统相关的高通量单核苷酸(SNP)检测方法为:基于双色荧光标签的高通量 SNP 分型技术^[5]、基于单碱基循环延伸的高灵敏突变检测技术^[6]、基于磁分离和 PCR array 的快速分子诊断^[7],以及基于磁分离的快速荧光免疫检测^[8]等。以上方法首先检测含有荧光染料 Cy3 和 Cy5^[8]的样品,然后分析检测得到的荧光信号,从而得到具有一定生物学和医学意义的结论。因此,荧光信号检测系统以及检测数据的处理与分析是整个系统的核心部件。

信号检测采用逐点扫描方式,即逐个探测微孔板每个单元的光信号,故图 1 以单个反应孔为例。典型的荧光信号检测系统包含激发光源、光通路、光电转换器以及控制电路等部分。激发光源一般为激光或氙灯。激发光源针对不同的荧光物质,产生不同波长的激发光,然后经过光通道的传导照射到样本上,样本中所含的荧光物质经过激发光的照射产生荧光,然后经过设计的光通路传导到光电传感器,将光信号转换成电信号。为了满足采样电路的需求,在光电传感器后还需要加入信号调理电路,放大有用信号,抑制噪声,从而提高信号检测的灵敏度。因此,一个完整的荧光检测光学系统包括:激发光源、光通路及光电传感器等部分。

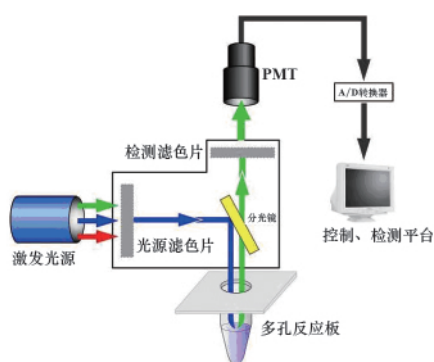


图 1 荧光信号检测系统原理

Fig. 1 Schematic of fluorescent signal detection system

1.2 硬件功能模块架构

本系统核心检测方法除 SNP 检测方法外,还包括基于功能化磁性纳米颗粒的核酸自动化提取技术^[6],以及靶序列的获取与放大技术^[6]。这些检测方法具有高通量、高灵敏度、低成本等特点,与软件有机结合,构成整个高通量核酸检测系统。

综合考虑系统成本、系统体积及核酸检测的通量等因素,最终选用 96 孔微孔板为本系统的反应容器,相应的磁分离系统、温控系统、荧光信号检测系统设计成适合于 96 孔微孔板系统,而移液装置设计成 8 通道样式,样本存储装置设计成适合于 48 孔板应用的装置。系统硬件部分主要由系统控制平台和 4 个功能模块组成。系统控制平台以 STM32 (Cortex-M3) 为主控芯片,通过 USB 总线与服务器端相连,使用 RS485 总线与各个功能模块相连。系统控制平台可以接受上位机的命令,将命令解析后发送给相应的功能模块,同时接收各个功能模块反馈的实时状态。本系统的功能模块包括:高通量磁分离系统、微量移液系统、精确温控系统和高通量荧光信号检测系统(图 2),各个模块在控制中心的协调调度下完成不同的功能。

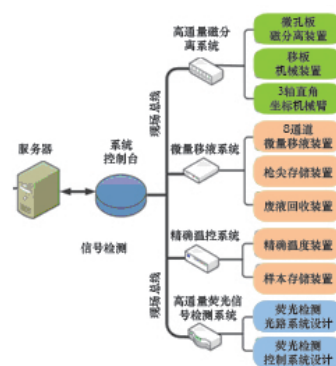


图 2 核酸检测系统硬件框图

Fig. 2 Block diagram of nucleic acid detection system

2 系统软件设计

本系统的操作软件运行于服务器或者 PC 机上,用户可以通过该软件设定相应的实验步骤和参数,对整个自动化平台进行控制。

在本设计中,下位机是以 C8051F 处理器为核心的硬件平台。下位机与上位机通信采用 RS-485 串口实现。系统上位机软件运行系统为 Windows 系列操作系统,开发环境为 Visual Studio 2005,为了实现界面美观、操作简便的目的,软件编写过程中使用 Xtreme ToolkitPro 及 GDI+类库。软件最终运行版本为 MFC 单文档应用程序,总体结构如图 3 所示。软件

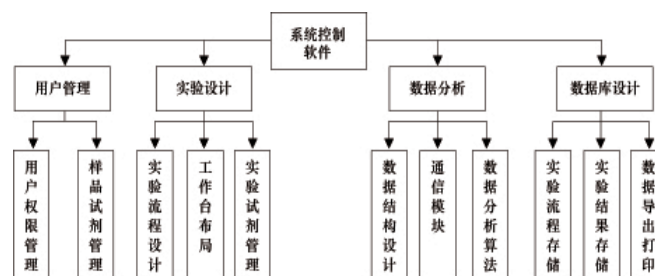


图 3 软件总体框图

Fig. 3 Block diagram of the software

主要功能为:用户管理,包括用户权限管理及样品试剂管理;实验设计,包括实验流程设计、工作台布局设置、实验试剂设置等;数据分析,包括数据结构设计、通信模块组建及相应的软件组织架构;数据库管理,包括实验流程及实验结果存储、导出实验结果等。

2.1 用户管理

核酸检测工作站可以完成多种实验流程,用户可以根据需要设计实验流程。不同的实验流程对系统的要求不同,例如,使用试剂种类的差别、试验结果存储的不同、用户的水平不同等,超级用户使用本系统设计实验流程进行学术研究,普通用户只需要熟练使用本系统完成相应的核酸检测。因此,本系统需要对用户及其权限进行管理。

用户管理部分主要包括用户权限管理、系统设置(系统校准与定位)等。用户分为超级管理员、管理员、普通用户。超级管理员拥有最高权限,可以增加用户、删除用户、禁止用户登录、可查看编辑所有用户在本机上建立的程序;管理员拥有部分管理权限,可以增加普通用户、禁止普通用户登录、查看普通用户在本机上建立的程序(能够完成日常维护及系统校准);普通用户没有管理权限,只能查看自己所建程序(仅能够使用程序,保持、管理个人数据)。系统设置包括对机械部分的校准程序、对移液模块的校准程序、对实验平台的坐标校准、对温控模块的校准、对信号检测模块的校准等。

2.2 数据结构

系统软件采用面向对象的编程思想,数据结构是整个软件系统的核心,它由 C++ 语言的类组成,这些类根据系统各个功能模块抽象而来。具体的实验流程可以根据功能拆分为一些可重复的动作,而这些动作对应于 C++ 语言中类的对象。系统功能模块包括转移液体、温度控制、温度开关、吹打混匀、转移 96 孔板/酶标板、磁分离、信号检测、动作循环执行、时间延迟、系统复位。系统的数据结构如图 4 所示。

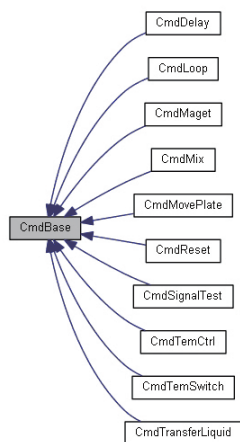


图 4 核心数据结构

Fig. 4 Block diagram of the core data structure

数据结构由类组成,类具有属性与特点两个基本特点,因此本系统数据结构也具有这两大特点。数据结构的属性为

各个功能模块的基本性质,操作是为完成能与下位机实现通信等行为。如转移液体模块,属性为液体转移的源地址、目标地址等;操作为从源地址抽取试剂,机械臂从源地址移动到目标地址,向目标地址注入试剂等。

2.3 实验流程设计及实验属性设置

实验设计部分包括实验台设置、实验步骤设置、样品试剂的管理、预运行和运行界面等。软件工作台布局和实验流程如图 5 所示。实验平台界面与仪器实际操作台一一对应,实验平台设置主要是用户向各个模块中添加样品及设定样品数量和数量、各种反应试剂以及反应板等,软件的设置务必与实际摆放一致。实验步骤设置包括生化实验的基本步骤:移液、移板、温控、信号检测、磁分离等。实验基本步骤通过树形控件实现。用户通过对这些基本步骤的自由组合,可完成相应的实验流程。实验流程采用动态链表存储,这样易于管理、维护。样品试剂的管理包括试剂添加、删除等操作,通过条码扫描来进行管理与维护,根据不同类型的试剂的性质(常温、避光、低温等)进行智能存储。预运行部分可将用户设定好的实验流程进行校验,提示用户本次实验所消耗的试剂量、吸头以及大概用时等信息,在用户确认无误后,进入模拟运行模式。用户通过模拟运行可发现实验设计中的逻辑性错误,进而进行实验修正。实验运行部分会实时显示实验平台中各个模块的情况(试剂量、温度等)、当前运行步骤、预计完成时间等信息。同时,用户的所有操作将以日志的形式自动存储。



图 5 软件工作台布局及实验流程

Fig. 5 Block diagram of the software workbench layout and the experiment flow chart

2.4 通信模块

本系统采用 SerialPort 实现上位机串口通信,该类封装 Windows API 函数。通信模块主要涉及 4 个线程:主线程、串口监视线程、帧判别线程和实验流程线程,结构见图 6。

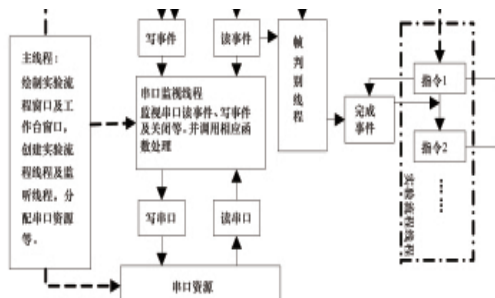


图 6 通信模块框图

Fig. 6 Block diagram of the communication module

(1) 主线程:实现应用程序的主要功能,包括属性设置、工作台布局设置、实验步骤设置、基本实验步骤等窗口的绘制,以及实验流程链表的建立。为应用程序分配相应资源,如串口资源,建立各线程通信事件,如串口写事件、读事件。创建线程,如实验流程线程、帧判别线程、串口监视线程等。

(2) 串口监视线程^[9]:本软件既要实时通过串口与下位机实现串口通信,又要实时更新工作台状态,还不能使进程一直等待,所以要产生一个后台监视线程实时监控串口状态,当监测到预定义的读写事件时,立即调用相应函数进行处理,如接收到数据就调用读函数将数据从串口中写入串口读缓冲区中,数据读数完成后,继续对串口进行监视,做到界面显示等串口通信两不误,既保证了通信实时性,又避免了资源浪费。

(3) 帧判别线程:本系统中,上位机与下位机通信数据为一些操作指令,包括帧头、地址信息、数据类型、数据长度、数据块、校验码、帧尾,通过 CRC 校验保证数据正确性,采用时间间隔法避免发生掉帧。

(4) 实验流程线程:本系统中发送命令过程为上位机实验流程线程发送一条待执行指令到串口,串口发送数据到下位机,上位机实验流程线程进入等待状态,下位机完成相应动作后返回一条完成指令。上位机收到完成指令,实验流程线程从等待状态唤醒,发送下一条待执行指令。

2.5 数据库模块

为了方便实验流程、实验数据的查询和管理,系统选用了 Access 2000 作为存储数据的工具,对用户设定过程中的数据(实验流程、工作台参数等)及检测结果进行保存。VC 提供了多种数据库访问方法,如 ODBC、ADO、DAO、OLE DB 等。其中,ODBC 和 ADO 技术是目前数据库程序开发中最常用的方法,本系统采用 ADO 技术实现。ADO (ActiveX Data Objects)是 Microsoft 提出的应用程序接口(API),用以实现访问关系或非关系数据库中的数据,它允许程序在 Visual C++、

Visual Basic、VBScript、Java 等编程语言中访问。在应用程序中,通过 ADO 和 SQL 语句配合,可以实现对数据库的一系列操作,例如创建数据库、创建表、创建索引、实现数据库的多重查询和数据汇总等。

3 结论

本文根据 SNP 检测方法,介绍了基于磁分离的高通量核酸检测系统构架,其中硬件模块包括高通量磁分离系统、微量移液系统、精确温控系统和高通量荧光信号检测系统。软件部分包括用户管理、实验设计、数据分析、数据库管理等功能。系统实现了实验流程设计及核酸的自动化检测,为下一步临床应用打下坚实基础。通过进一步深入研究,可望实现快速、高效、多样本、多位点、高通量核酸检测。系统中荧光信号检测系统具有较强的通用性,可在其他方面得到应用。

参考文献 (References)

- [1] 滕晓坤,肖华胜.基因芯片与高通量 DNA 测序技术前景分析[J].中国科学,2008,38(10):891-899.
Teng Xiaokun, Xiao Huasheng. Science in China, 2008, 38 (10): 891-899.
- [2] Jenkins S, Gibson N. High-throughput SNP genotyping [J]. Comparative and Functional Genomics, 2002, 3(1): 57-66.
- [3] 刘洪娜,李松.基于磁性颗粒微阵列与双色荧光杂交的单核苷酸多态性分型方法研究[J].分析化学,2010,38(12):1708-1713.
Liu Hongna, Li Song. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38 (12): 1708-1713.
- [4] 尹桂青,万遂人,何农跃.基于嵌入式 linux 的核酸分析系统研究[J].中国电子商情:通信市场,2011(6):169-174.
Yin Guiqing, Wan Suiren, He Nongyue. Telecom Market, 2011 (6): 169-174.
- [5] 刘洪娜.基于磁性纳米粒子 PCR 的高通量单核苷酸多态性分型方法[D].株洲:湖南工业大学,2007.
Liu Hongna. High-throughput SNP Genotyping with PCR Amplification on Magnetic Nanoparticles[D]. Zhuzhou: Hunan University of Technology, 2007.
- [6] 张小燕,左明雪.用基因芯片检测单核苷酸多态性反应原理 [J].中国生物工程杂志,2005,25(11):52-56.
Zhang Xiaoyan, Zuo Mingxue. Progress in Biotechnology, 2005, 25(11): 52-56.
- [7] 刘宾,覃斌兵,刘洪娜,等.全自动核酸分子诊断系统的某些进展[J].现代科学仪器,2010,4(2):165-168.
Liu Bin, Tan Binbing, Liu Hongna, et al. Modern Scientific Instruments, 2010, 4(2): 165-168.
- [8] 杨祥宇,宋健,冯荣秀.荧光标记染料[J].化学通报,2003,66(9):616-622.
Yang Xiangyu, Song Jian, Feng Rongxiu. Chemistry, 2003, 66 (9): 616-622.
- [9] 谷庆华,李成贵.基于 VC++ 和数据库的实时温度监控系统软件的开发[J].北京联合大学学报:自然科学版,2007,21(4):20-24.
Gu Qinghua, Li Chenggui. Journal of Beijing Union University: Natural Sciences Edition, 2007, 21(4): 20-24.

(责任编辑 马宇红,朱宇)