

基于新冠病毒荧光检测的 RT-qPCR 温控系统

明 焱¹ 冯汝鹏² 朴永杰²(1.民航机场规划设计研究总院有限公司西北分公司 西安 710000; 2.中国科学院长春光学
精密机械与物理研究所 长春 130033)

摘要: 实时荧光定量聚合酶链式反应是新型冠状病毒 COVID-19 快速检测的重要手段,病毒样本经过一系列复杂的化学反应处理后通过 RT-qPCR 温控系统得到检测结果,RT-qPCR 温控仪实际就是一台精准的测温、控温仪和光谱检测设备。采用 ARM 处理器+H 桥驱动器+帕尔贴的设计架构,通过归一化 PID 算法解决温度的快速升降问题,从而构建低成本、小型化的温控系统。该系统可以根据不同的温度设定和荧光剂选择适用其他病毒的核酸检测,整体控温指标可以达到升温速度不小于 15 °C/s、降温速度不小于 8 °C/s、温度精度 0.1 °C 以内、升降温过冲小于 4 °C,稳定时间 3 s。

关键词: RT-qPCR; COVID-19; 病毒样本; PID; 温控系统; 核酸检测

中图分类号: TP394.1 **文献标识码:** A **国家标准学科分类代码:** 510.3040

The RT-qPCR temperature control system based on COVID-19 fluorescence detection

Ming Yan¹ Feng Rupeng² Piao Yongjie²(1.China Airport Planning & Design Institute Co., Ltd., Northwest Branch, Xi'an 710000, China;
2.Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: Real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction is an important means of rapid detection of new coronavirus COVID-19. After sampling a series of complex chemical reactions, the virus results were obtained through the RT-qPCR temperature control system. The RT-qPCR temperature controller is actually an accurate temperature controller and spectral detection electronic equipment. This paper adopts the design architecture included ARM processor, H-bridge driver and Peltier, meanwhile realizes the rapid rise and fall of temperature through normalized PID algorithm. So as to build a low-cost and miniaturized temperature control system. The system can select nuclear acid detection suitable for other viruses according to the different temperature settings and fluorescent agents, and the temperature control can achieve the heating rate of not less than 15 °C/s. The cooling rate shall not be less than 8 °C/s, the temperature accuracy shall be within 0.1 °C, the overshoot of temperature rise and fall shall be less than 4 °C, and the stability time shall be 3 s.

Keywords: RT-qPCR; COVID-19; virus samples; PID; temperature control system; nucleic acid detection

0 引言

随着社会的科学进步与发展,人类面临的地球也在日新月异的变化,未知的病毒也侵害着人类。新型冠状病毒可怕的传播性和致命的变异对人类生存产生着巨大的威胁,现今如此高科技的手段仍然束手无策,没有找到一种直接的特效药,该疫情持续两年已久。因此,对于病毒、细菌等生物疫情的检测是现今社会的一种有效长期的保障,防患于未然^[1]。

核酸检测是确诊新型冠状病毒感染的主要依据和手段,目前用于 RNA 病毒的核酸检测技术主要有基因测序、RT-qPCR 检测、基因芯片和恒温核酸扩增等^[2]。RT-qPCR 检测可以通过扩增病毒的特异性片段来定性判断是否感染病毒,其中实时荧光 RT-qPCR 作为确诊的最常用的诊断标准之一,被选入我国《新型冠状病毒的肺炎诊疗方案(试行第七版)》^[3]。该检测方法可以检测多种临床样品,例如血液、痰液、支气管肺泡灌洗液、咽鼻拭子、粪便等。RT-qPCR 具有灵敏、快速、特异性高、适用样品种类多、重

复性好等特点,是较为理想的检测方法^[4-5]。

核酸检测中关键的一步需要对样本进行多个温度循环的 cDNA 扩增,变温速度的快慢和精度间接影响到检测的效率和灵敏度。本文的设计就是针对 RT-qPCR 的新型冠状病毒荧光检测的温控系统。常规设计中采用加热丝主动加热进行升温,利用风扇空气对流方式物理降温,这种方法升温可以满足要求,但是降温速度缓慢,受环境影响较大,很难满足实际要求,因此需要更好的降温手段。本文设计采用 ARM 处理器 + H 桥驱动器架构,利用帕尔贴(Peltier)的双向热传导特性很好地解决快速升降温问题,辅助以小型风扇完成大量热量的传输,降温效率达到最高,同时针对帕尔贴和风扇联合控制提出一种归一化的 PID 算法,将帕尔贴热传导的控制变量和风扇风力的控制变量统一到一个 PID 输出上,有效地保证了温度控制的速度和稳定性,进而达到升温速度不小于 15 °C/s,降温速度不小于 8 °C/s,温度精度 0.1 °C,温度过冲小于 4 °C,温度稳定时间 3 s 的控制指标。最后通过对不同荧光剂的激发与光谱检测得到核酸的检测结果。

该设备是一种低成本、小型化、高效且具有荧光激发与检测的 RT-qPCR 温控系统。在变性温度、复性温度和延伸温度之间都能很好地进行控制与检测。

1 系统设计

1.1 基本原理

新型冠状病毒在进行 RT-qPCR 检测前需要经过一系列复杂的化学反应预处理^[6-7],如图 1 所示。将得到的 RNA 中掺入某周特异性引物启动逆转录得到病毒 cDNA,一段标记有 6-FAM 荧光分子的 cDNA 会在 490 nm 波长单色光激发下发射出 520 nm 波长左右强烈的黄绿色荧光信号,检测中需要克服荧光共振能量转移(FRTE)效果,使得 6-FAM 荧光分子可以与 6-TAMRA 淬灭分子在空间上相互远离,阻止荧光分子吸收 490 nm 波长光后发射跃迁时释放出来的 520 nm 波长单色光被吸收。最终通过光谱检测得到病毒核酸检测阳性的结果^[8]。同时,样本中病毒 RNA 含量越高,RT-qPCR 过程产生的游离 6-FAM 荧光报告分子越多,因此病毒含量与荧光型号强度成正比,实际中通过反复的温度变化扩增 cDNA 来增加荧光产物。最后通过内标法就可以定量得出样本的新冠病毒载量^[9]。

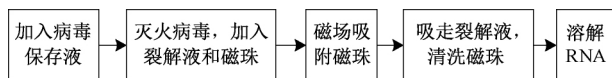


图 1 核酸样本预处理流程

病毒进入逆转录过程才是 RT-qPCR 工作的开始,也是本文温控系统设计的实际使用方向。

1.2 硬件组成

如图 2 所示,RT-qPCR 温控仪是一个小型的控温和检测系统,其主要由主控板、帕尔贴、温度传感器、荧光激发二

极管、光电探测器、小型风扇、样本收集器、机械结构框和上位机等部分共同组成。

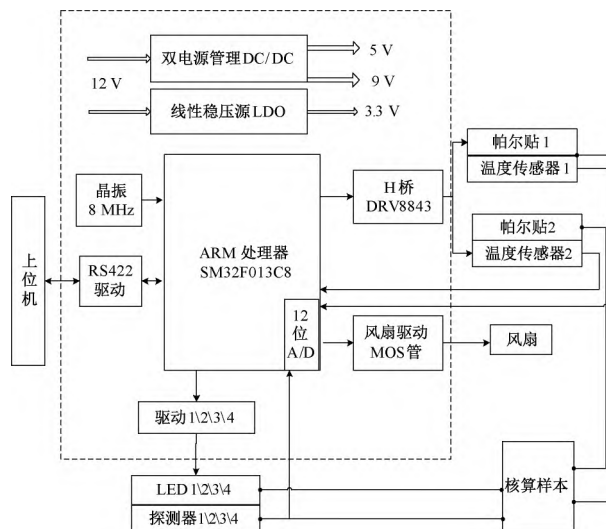


图 2 核酸检测系统框图

1.3 功能要求

不同核酸样本的生物特性不同,其检测循环过程和要求也有差异。基于新型冠状病毒荧光检测的 RT-qPCR 温控系统流程如下。

- 1) 样本温度保持在 50 °C 持续 500 s,该过程为核酸 RNA 逆转录过程,该过程中荧光激发及检测部分不工作。
- 2) 样本温度上升到 95 °C 持续 100 s,该过程 DNA 水解会变成单链,过程中荧光激发与检测部分不工作。
- 3) 样本开始温度循环,温度在 6 s 内从 95 °C 下降到 60 °C,在 60 °C 持续 20 s,引物与单链按碱基互补配对原则结合,温度在 4 s 内从 60 °C 上升到 95 °C,在 95 °C 持续 20 s, DNA 聚合酶沿着磷酸到五碳糖(5'-3')的方向合成互补链,至此为一个温度循环周期,该过程为聚合酶链式反应扩增。
- 4) 步骤 3) 在 95 °C 和 60 °C 之间往复升降温并持续短暂时间,整个检测过程中会连续出现 30~45 个 PCR 扩增的温度循环周期,样本在温度 60 °C 持续的 20 s 时间内,4 种荧光激发二极管依次点亮,光电探测器依次采集电信号。
- 5) 将多次采集到的 AD 转化结果与样本特征比较,最终得到检测结果。

1.4 设计思路

为了使系统可适用于不同流程的核酸病毒检测,系统硬件主要负责快速精准控温、交互通信、荧光通道的控制和实时检测等主要功能。上位机可以通过 RS422 通信或 CAN 通信进行实际的流程控制,包括温度设定、恒温时间、荧光激发二极管的开启时间、光电探测器采集信号的获取、PID 参数修正等功能,该设计灵活性强,利于上位机软件二次开发。

考虑到系统的尺寸、成本和量产问题,硬件选择 ARM 处理器 + H 桥驱动器的设计方案,外围电路相对简单和可

靠^[10]。外部传感器和执行部件采用集成负温度系数热敏电阻的帕尔贴,利于精准测温和小型化。同时荧光激发器采用主波长分别为 490、520、625 nm 和色坐标($X=0.43$, $Y=0.395$)的光电二极管。开关控制量全部采用 N 型场效应管控制,使用时间长且耐损耗。

帕尔贴和风扇联合控制的归一化 PID 算法可以有效保证控温精度、减小温度过冲,使 cDNA 扩增工作在适宜的环境中。

2 归一化 PID 设计

2.1 常规 PID 控制

自动控制系统中常规 PID 算法分为增量式和绝对式两种,广泛使用于非线性、时变的系统中^[11]。PID 算法可以实现更好的动态性能,对内外扰动引起的环境变化具有更好的鲁棒性^[12]。

绝对式 PID 控制器属于线性控制器,系统误差 $e(k)$ 表达式如下:

$$e(k) = y(k) - x(k) \quad (1)$$

式中: $y(k)$ 表示控制系统给定的目标值, $x(k)$ 表示当前控制系统实测值。

输出值 $u(k)$ 的数学表达式如下:

$$u(k) = k_p * e(k) + k_i * \sum_{k=1}^n e(k) + k_d * (e(k) + e(k-1)) \quad (2)$$

式中: $u(k)$ 表示温度控制系统的输出值; $e(k)$ 表示误差值; k_p 表示比例因子; k_i 表示积分因子; k_d 表示微分因子。

2.2 归一化 PID 设计

帕尔贴可以通过调整供电电压改变电流,电压可以通过占空比来控制,这样找到了帕尔贴的输出控制量,即占空比定时器有效计数。

风扇为直流电机控制,电机速度的控制量同样是改变供电电压占空比即定时器有效计数^[13]。虽然知道控制量是什么,但是并不知道控制量对应温度变化量的量化指标。此时控制策略的最佳方案就是采用 PID 控制,同样面临一个问题,常规情况下 PID 控制同一个输入只能输出一个控制量,这里需要产生帕尔贴有效脉计数和风扇有效脉计数两个输出控制量,达到联合降温的效果,需要将两者进行整合,因此提出控制量归一化 PID 设计。

控制量归一化 PID 设计就是让帕尔贴的控制量和风扇的控制量之间建立某种联系,实际测试中我们发现降温过程中帕尔贴的占空比不能超过 50%,如果超过 50%会导致散热能力不足将冷端温度带高,从而降低降温速度。同时风扇由于电机特性,当电流过小时由于自身摩擦力矩等影响电机可能无法正常转动,表现出非线性关系,所以实际中最好将风扇的占空比控制在 30%以上,通过以上分析建立线性关系如下:

$$Wind_{mm} = Peltier_{mm} * a + b \quad (3)$$

其中, $Wind_{num}$ 为风扇有效计数, $Peltier_{num}$ 为帕尔贴有效计数, a 为线性系数, b 初始占空比有效计数。通过常规绝对式 PID 算法可以求得 $Peltier_{num}$ 值, 利用式 (3) 得到 $Wind_{num}$ 值, 从而得到有效控制输出。

3 电子学设计

3.1 硬件设计

选择 ST 公司 STM32F013C8 芯片作为控制系统的核心处理器,该芯片是意法半导体生产的 32 位高性能、低成本的增强型微控制器,内核采用 ARM 公司 Cortex-M3 架构,芯片内部集成 64 KB 的 Flash 程序存储器和 20 KB 的数据存储器,支持最大 16 通道 12 bit 的 AD 采集,外部支持 USART 和 CAN 总线通信接口,7 个通用的 DMA 控制器,外部仅需要供电和晶振就可以构建最小系统,可以满足基本的通信、模拟量采集和驱动输出等功能,其接口配置关系如图 3 所示^[14]。

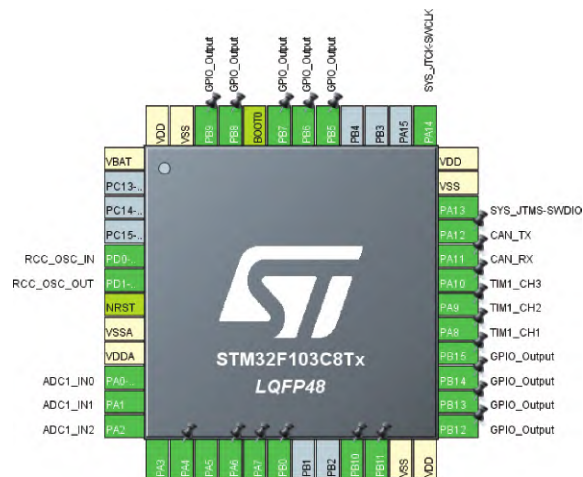


图 3 STM32F103C8 对外配置接口图

USART 通过芯片 MAX3490EESA 转换成 RS-422 差分信号,增加信号的抗干扰能力,使得传输距离可以达到 10 m 以上。CAN 总线通信通过 SN65HV230D 接口芯片传输 CANL 和 CANH 两种信号,在 40 m 距离内最大速率支持 1 Mbit/s。

帕尔贴的驱动控制与两项混合式步进电机控制原理基本相似,均是控制电流大小和方向。如图 4 所示,本设计采用 TI 公司双路 H 桥驱动器 DRV8843,工作电压 $8.2 \sim 45 \text{ V}$,峰值电流高达 2.5 A ,均方根电流 1.75 A 。4 个引脚 AI0、AI1、BI0、BI1 全部接地选择固定 100% 占空比电流调节。PWM 脉冲通过 AIN1、AIN2、BIN1、BIN2 引脚进行电压调节,复位信号 nRESET 连接到处理器通用 I/O 的 PB8 引脚进行复位,过热反馈信号 nFAULT 与处理器中断相连,时刻监测驱动器温度状态。

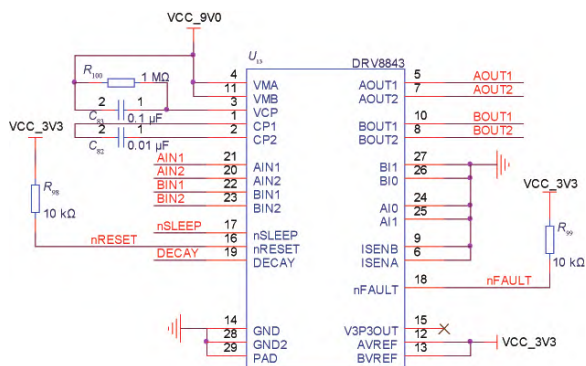


图 4 DRV8843 对外连接图

帕尔贴学名制冷片或者半导体制冷片,当电流通过不同的导体组成的回路时,除产生不可逆的焦耳热外,在不同导体的接头处随着电流方向的不同分别出现吸热、放热两种现象。工程中可以理解为通过控制电流方向控制热量分布。帕尔贴分为冷端和热端,实际使用中由于帕尔贴体积较小,冷端制冷下要保证热端散热良好,否则帕尔贴会整体温度升高达不到制冷效果。本设计定制的帕尔贴参数 $V_{\max}$ 电压 9.7 V, $I_{\max}$ 电流 1.8 A, $Q_{\max}$ 功耗 9.6 W,帕尔贴工作原理如图 5 所示。

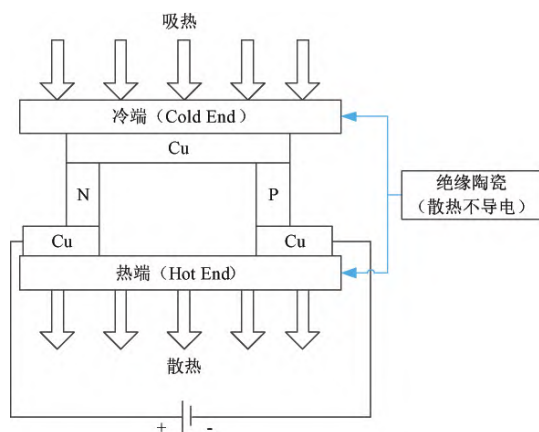


图 5 帕尔贴工作效果图

帕尔贴内部集成了负温度系数热敏电阻,可以对样本进行很好地温度测量,负温度系数热敏电阻公式:

$$T = B / (B / T_N + \ln(R_T / R_N)) \quad (4)$$

其中, B 为热敏指数, R_N 为 T_N 下零功率电阻阻值, R_T 为输出电阻阻值,厂家出场前会提供以上值供用户参考,只需要测量 R_T 电阻的阻值就能换算被测物温度。常规设计中采用电阻分压求阻值的方式。

4 种谱段的荧光激发器型号分别为 INL-3AB30、INL-3AG30、QBL7IW30C-WW、LTH3MM12VFR4100。根据正向导通电流值 (IF) 设计串联电阻分压到达最佳工作区。通过 N 型 MOS 管 FDT86224 控制二极管的开关和风扇的速度,处理器输出电平 3.3 V 通过三极管 MMBT2222A 放大到 6 V,下拉电阻 R_{98} 可以起到静电防护

作用,当 V_{GS} 为 6 V 时,导通电阻 $R_{DS(on)}$ 仅为 178 mΩ, I_D 为 2.4 A。控制原理如图 6 所示。

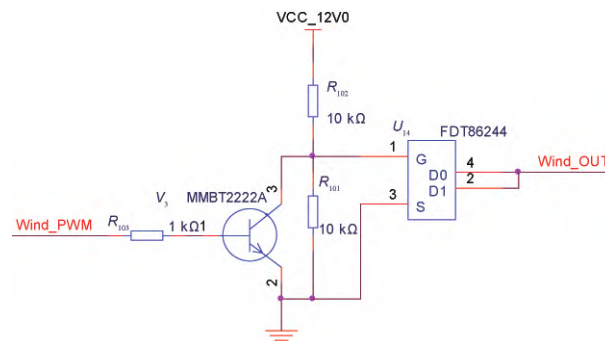


图 6 开关控制原理

TSL257 是一款低噪声光压转换器件,内部集成了阻抗匹配放大器,专门应用于范围 400~700 nm 波长光的接收,输出电压在 $\lambda_p = 470$ nm 时, $E_e = 1.54$ MW/cm²,如图 7 所示。

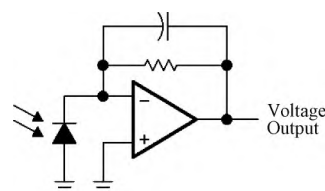


图 7 TSL257 工作原理

3.2 软件设计

基于 ARM 系统的软件主要由 PWM 控制模块、PID 算法模块、温度采集模块、开关控制模块和通信模块 5 部分组成,软件流程如图 8 所示。

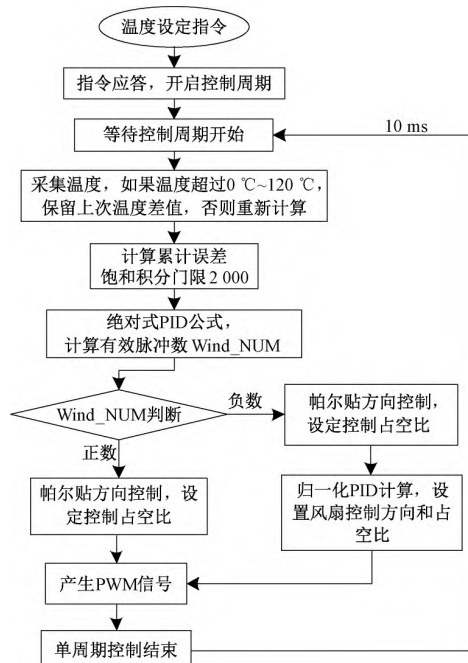


图 8 软件流程

外部 8 MHz 有源晶振通过 PLL 锁相环倍频到 72 MHz 主频,作为系统运行的主时钟。

定时器 2 预分频设置为 72,计数周期为 10 000,向上计数自动重加载方式,PID 控制周期为 100 Hz,以轮询方式查找 Time_out 值,当 Time_out 为 1 时,执行 PID 控制算法并清零 Time_out,实际中算法通过 HAL_TIM_Base_Start_IT(&htim2)开启。

定时器 1 兼顾 PWM 生成功能,同样预分频设置为 72,计数周期为 1 000,向上计数自动重加载方式,选择 PWM model 模式,脉冲极性高电平有效,这样产生 2 路频率为 1 kHz 的 PWM 信号分别用于控制帕尔贴和风扇,占空比可以根据有效计数从 0%~100%动态调整。

ARM 自带 DMA 控制器支持外设寄存器数据到指定存储位置的传输^[15]。这样可以在不牺牲系统效率的情况下实时处理数据,该控制器通过 HAL_NVIC_EnableIRQ(DMA1_Channel1_IRQn)使能。

ADC1 采用持续扫描模式,数据排列方式为左对齐,启动模数转换后,DMA 实时将数据循环存储在数组 adc_value 中,每个模拟量存储 4 次,采用中值滤波算法对温度进行滤波处理并存储在数组 adc_value_mean 中。当 PID 控制需要温度值或者上位机需要调用 TSL257 的光电转换结果时,可以直接从 adc_value_mean 中提取,adc_value_mean 中数据在主程序 while 中时刻更新。由于 ADC1 存在系统误差,使用前必须通过 HAL_ADCEX_Calibration_Start(&hadc1)进行自校准。

UART 通信采用标准的通信格式,波特率设定为 115 200 bps,长度 8 bit,无奇偶校验位。参数通过 HAL_UART_Init(&huart3)完成初始化。

4 实物及实验结果

4.1 实 物

RT-qPCR 温控系统如图 9 所示,其中白色部分为实际承载样本的收集器,左右两块小电路板分别为荧光激发板和光电探测板,中心为核心处理板,可以支持定制 PCI 接口。



图 9 RT-qPCR 温控系统硬件实物图

4.2 实验结果

为了验证该系统实际工作状况和归一化 PID 算法的效果,分别选取 3 种参数,参数 1: $a=1, b=300$;参数 2: $a=1, b_1=0$;参数 3:单风扇制冷。上位机 PC 通过串口设定目标温度后以 10 Hz 实时采集温度值并绘制成曲线,如图 10 所示。

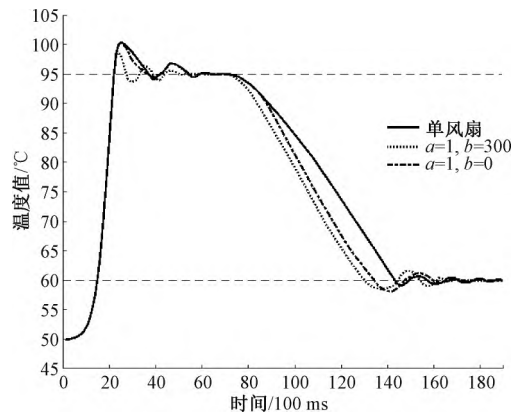


图 10 不同参数下温度变化曲线图

由图 10 可以得到表 1 升降温及温度过冲情况。综合可知 3 组参数升温基本时间相同,参数 1 的升温稳定时间更短、降温效果最好;参数 2 由于风扇有效占空比从 0 开始,前期无法转动影响降温效果,导致降温时间延长;参数 3 仅仅依靠风扇降温速度缓慢,很难满足时间要求,但是相对过冲很小。

表 1 不同参数升降温时间及温度过冲表

状态	升温 时间/s	升温 稳定/s	升温 过冲/°C	降温 时间/s	降温 稳定/s	降温 过冲/°C
参数 1	2.2	2.3	3	6	3	2
参数 2	2.2	3.5	5	6.6	3.4	2.3
参数 3	2.2	3.5	5	8	4.3	1.8

5 结 论

本文以 ARM 处理器+H 桥驱动器+帕尔贴的硬件架构有效解决了核酸检测中的 cDNA 扩增多个循环 RT-qPCR 的温控问题,并通过归一化的 PID 算法将帕尔贴和风扇输出控制量结合,有效地增加了降温速度,维持了温度稳定性,大大缩短了检测周期,同时避免了采用两套 PID 参数设计的复杂性。该温控系统集成了不同荧光激发和光谱检测作用,整体扩展性强、成本低、具有一定的实用价值,但是光谱检测技术的灵敏度和准确性仍有待提高和研究。

参考文献

- [1] 陈晨,胡劲超,曹姗姗,等.新型冠状病毒抗原快速检测研发现状及展望[J].中国生物工程杂志,2021,41(6): 119-128.

- [2] 李欢,徐秋月,王云娟,等.利用逆转录环介导恒温扩增技术建立新型冠状病毒核酸快速检测方法[J].昆明医科大学学报,2021,42(9):25-31.
- [3] 陈立娥,王延飞.2019-nCoV 检测方法的研究进展[J].滨州医学院学报,2021,44(2):153-156.
- [4] CORMANVM, LANDT O, KAISER M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR[J]. Eurosurveillance, 2020, 25(3): 2000045.
- [5] KIM J, JUNG S, KIM M Y, et al. Thermo-responsive polymers in real-time one-step RT-PCR for highly multiplex RNA analysis [J]. Advanced Healthcare Materials, 2020, 9(7): 1900790.
- [6] QIN Z, PENG R, BARAVIK I K, et al. Fighting COVID-19: Integrated micro and nanosystems for viral infection diagnostics[J]. Matter, 2020, 3(3): 628-651.
- [7] THOMPSON D, LEI Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection[J]. Sensors and Actuators Reports, 2020, 2(1): 100017.
- [8] 金剑,杨雪苹,程景话,等.“化”说新型冠状病毒核酸检测[J].广东化工,2021,20(48):220-222.
- [9] GOODWIN S, MCPHERSON J D, MCCOMBIE W R. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies[J]. Nature Reviews Genetics, 2016, 17(6): 333-351.
- [10] 赵一帆,管雪元,刘雨顺.基于 ARM 的多路采集系统设计[J].电子测量技术,2021,44(15):142-148.
- [11] 陶彦吉,余淑荣,吴明亮,等.基于 STM32 单片机的锅炉燃烧控制系统设计[J].电子测量技术,2018,41(24):134-138.
- [12] LU L, DING Y U X, SHUO Z. General type industrial temperature system control based on fuzzy fractional-order PID controller [J]. Complex & Intelligent Systems, 2021, 33: 1-13.
- [13] 魏丽君.基于 STM32 的智能调速跟踪风扇设计[J].电子测量技术,2020,43(15):177-181.
- [14] 王春宇,张斌,韩旭.基于 STM32 的大口径望远镜温湿度监测系统[J].电子测量技术,2020,43(16):28-31.
- [15] 侯志伟,包理群,杜青青.基于 STM32 的多通道温度测量系统研究与设计[J].工业仪表与自动化装置,2021,5:50-55.

作者简介

明焱,高级工程师,主要研究方向为明航机场导航及检测仪器设备等电子学研究。

E-mail: 174232032@qq.com

冯汝鹏,副研究员,主要研究方向为星上电子学产品设计。

E-mail: xinlan_feng@163.com

朴永杰,副研究员,主要研究方向为星上电子学系统及图像传输处理等方面研究。

E-mail: pyj0314@163.com