

基于 STM32 和 LABVIEW 的多通道 DNA 合成仪控制系统的设计

张莉^{1,2} 王尧^{1,2}

(1 中南民族大学 生物医学工程学院, 武汉 430074; 2 中南民族大学 检测与仪器校级工程中心, 武汉 430074)

摘要 将合成 DNA 的固相亚磷酸酰胺法与自动控制技术相结合, 设计了一款基于 STM32 的 96 通道寡核苷酸长链的合成仪。该 DNA 合成仪以 STM32F103ZET6 微控制器为主控芯片, 接收、处理上位机发送的指令, 并控制外围的执行单元。人机交互界面采用 LabVIEW 开发, 具有合成序列多通道输入、工作状态监控、与主控系统实时通信等功能。该 DNA 合成仪控制系统可同时实现 96 个独立通道的寡核苷酸长链的合成, 具有合成效率高、操作界面友好、操作方便等优点, 完全满足中小型实验室及社区医院的碱基合成需求。

关键词 磷酸酰胺法; DNA 合成仪; STM32 微控制器

中图分类号 TP273 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2017)04-0078-06

Design of Multi-Channel DNA Synthesizer Control System Based on STM32 and LabVIEW

Zhang Li^{1,2}, Wang Rao^{1,2}

(1 College of Biomedical Engineering, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;

2 Testing and Instrumentation Engineering Center, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract Combining solid phase phosphoramidite method of DNA synthesis with automatic control technology, a DNA synthesizer of 96 oligonucleotides long chain is designed based on STM32. The core of DNA synthesizer is STM32F103ZET6 microcontroller, who is used for receiving and processing instruction from upper computer, and controlling peripheral circuit module. Based on LabVIEW development platform, application software of upper computer is built, which has function of synthetic sequence multichannel input, working state monitoring and real-time communication with control system. The DNA synthesizer researched in this paper can achieve composition of 96 independent channel oligonucleotides long chain at the same time. It has many advantages, such as high synthetic efficiency, friendly operation interface, and easy operation mode. The DNA synthesizer can fully satisfy requirement of base composition of small and medium-sized laboratory and community hospital.

Keywords phosphoramidite; DNA synthesizer; STM32 microcontroller

DNA 合成技术在基因及调控组件的合成、基因回路和生物合成途径的重新设计组装, 以及基因组的人工合成等方面都有重要的应用^[1]。21 世纪以来 DNA 合成技术发展迅速, 在能源、重大疾病诊断与治疗、环境、医药等领域得到广泛应用, 具有巨大的社会效益及经济效益。

DNA 合成仪是设计用于合成结构上类似 DNA 的寡核苷酸的自动化仪器, 目前高通量 DNA 合成广泛采用固相亚磷酸酰胺法合成, 它以多孔玻璃为固相载体, 微升级体积的不同试剂经脱保护、偶联、带帽和氧化四

步反应循环, 将核苷酸单体耦合到核苷酸链上^[2-5]。该方法具有偶联效率高、起始反应物比较稳定等优点, 可用于固相合成并实现自动化。

DNA 合成仪是实现 DNA 合成过程自动化、标准化的技术手段。目前国内进行批量合成使用的多通道 DNA 合成仪均以少于 96 通道合成为主, 产品更新换代慢, 且尚未有国产多通道高通量 DNA 合成仪问世^[6]。中国是世界自动化分析检测仪器最重要的市场之一, 对于高通量多通道的 DNA 合成仪还大量依赖进口, 而进口 DNA 合成仪价格昂贵、维护成本高、维修周期长。

收稿日期 2017-02-27

作者简介 张莉(1972-), 女, 教授, 博士, 研究方向: 激光物理、非线性系统的随机动力学、信号检测与处理、光电检测与医疗仪器相关技术研发, E-mail: Zhangli1996@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81101080)

进口仪器合成过程繁杂,对于非专业的操作人员很难在短时间内配置好所需参数,用户无法根据需求灵活设置。为此,本文设计了一款操作界面简单灵活,人性化的多通道高通量DNA合成仪,该合成仪可以在96孔反应板的每一孔独立实现寡核苷酸长链的合成。

1 系统总体设计

DNA合成仪主要由软件系统、STM32中央控制器、传动系统、气路系统、液路系统五大部分组成。STM32中央控制器它是连接传动系统、气路系统、液路系统之间的桥梁,负责传动系统在指定位置完成相应的动作,控制气路、液路的加压排液和保证合成反应所需的气压和环境,将反馈信息通过特定的通信协议传送给控

制软件,接收控制软件的命令并执行;传动系统负责把电磁阀板传送到与合成板孔的相对位置;气路系统主要负责试剂瓶、碱基瓶精确压力控制,气路整体的加压排液控制,合成反应惰性环境的控制,各路电磁阀板加液时试剂所需压强和不成合成时对废液及洗涤液的压力控制等;液路系统的主要功能是把参与合成反应的10种试剂分别一分为8路液体输出管路;软件系统是DNA合成仪的核心,是决定其合成效率、合成效果的关键因素。基于labview开发的控制软件完成用户对合成板指定板孔的选择、对指定板孔的合成序列的输入,输入碱基序列参数解析后通过RS485通讯协议把相关电磁阀开关指令信息分步骤传送给STM32控制系统,其系统整体框图如图1所示。

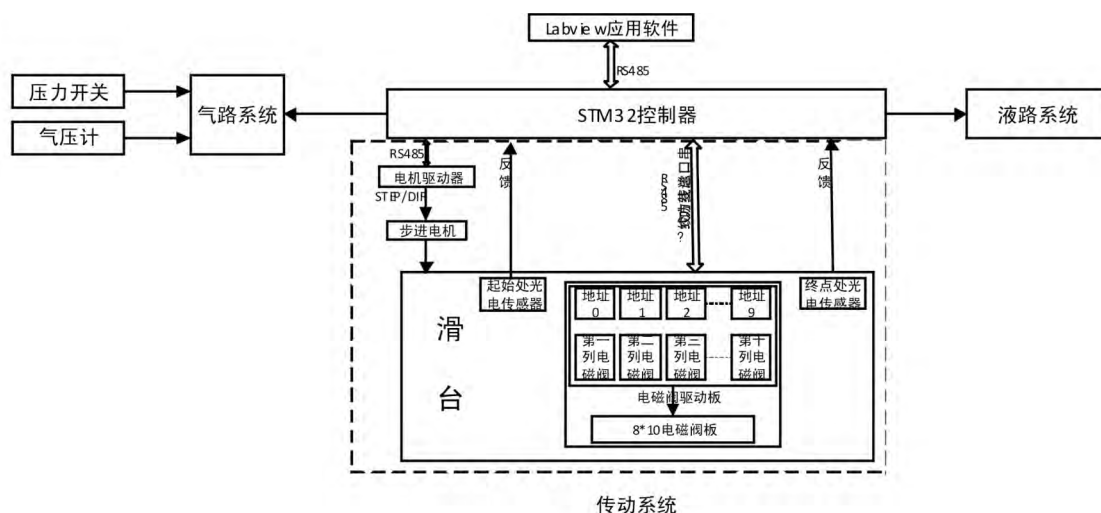


图1 系统整体框图

Fig.1 Overall system block diagram

2 控制系统设计

2.1 气路控制系统的设计

DNA合成仪合成试剂需要保持内外气体隔绝且需要在一定压强下才能达到更高的耦合率,因此气路系统整体的密闭性、对气压控制优劣性直接决定所需合成引物的合成效率。气路系统设计主要包括合成试剂瓶精确压力控制、合成反应仓惰性环境控制、各分流气路的加压排液控制、对洗涤液和废液外排气路控制等。合成反应试剂通过多级气压计和压力开关的检测,与多路高精度的微流体调压阀相结合,保证了各气路压强稳定在微小的波动范围内。在合成反应仓处我们配备了加压和减压的气压阀,保证合成所需压强环境,当合成完毕,反应仓先排气降压再排液。其气路系统设计如图2所示。

2.2 液路控制系统的设计

固相亚磷酸酰胺法是目前最常用的DNA固相合成方法,具有高效、快速的偶联以及起始反应物稳定等特点^[3]。该方法主要步骤是脱保护基、缩合反应、带帽反应、氧化反应四个步骤循环完成DNA链的合成。该合成策略也是本文DNA合成仪设计的主要依据之一。在合成过程中会涉及到十种试剂(试剂1,试剂2,试剂3,试剂4,试剂A,试剂T,试剂G,试剂C,试剂5,试剂6)参与反应,试剂的添加次序依次是:试剂1-4-所需碱基(A、T、G、C)-5-6。我们将每种试剂一分为8路,对应96反应孔板的8行,每一路连接一个电磁阀,这样10种试剂被分成 8×10 路,由 8×10 个电磁阀组成了液路系统。 8×10 电磁阀组中每个电磁阀开关都是独立的,由控制器根据合成需要打开相应的电磁阀开关。本液路控制系统选用了密封型好、无内部容积结构、耐腐蚀的隔膜电磁阀为控制载体来保证每一路的液体流量的均一性,设计原理如图3所示。

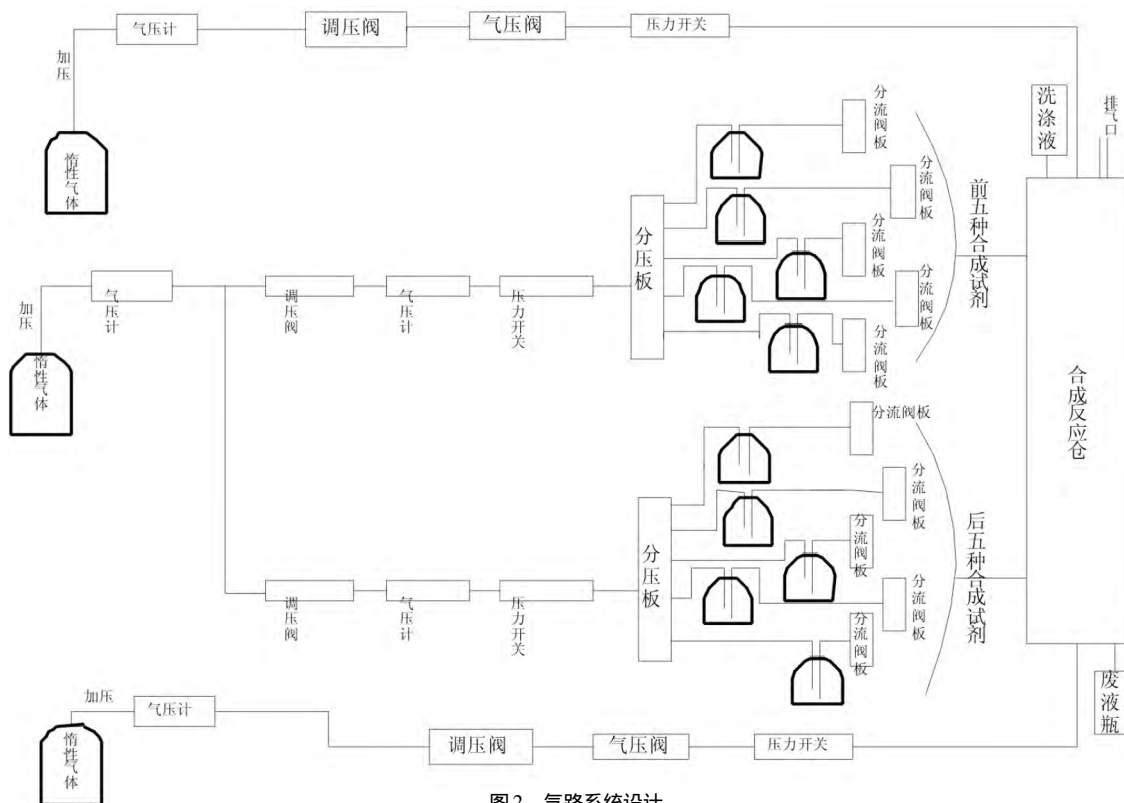


图2 气路系统设计

Fig.2 Gas path system design

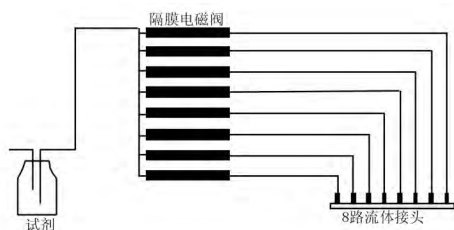


图3 液路系统设计

Fig.3 Fluid system design

2.3 传动控制系统设计

合成DNA时,装有10种合成试剂的8×10的电磁阀板在8×12的合成孔板上回来运动,完成每个版孔的试剂添加.电磁阀板有10列,合成孔板有12列.电磁阀板从第一列与合成板孔第一列对齐,到电磁阀板第十列完全走出合成孔板需要22步.因此我们把步进电机运动22步规定为一趟,而来回的趟数由用户输入的最长的碱基序列数决定.每一列的8路试剂液出口和96合成孔板具体某一列相对位置的定位精度是决定传动系统是否满足要求的最重要衡量标准,为提高传动系统重复运动定位精度,我们在传动系统运动的起点和终点处都设定了重复定位精度达到0.1mm光电传感器,并设计了减少电机负载,每次合成前重新校准原点位置等步骤.首先,传动系统启动前,气路系统会在传动系统两端进气口加压,一来赶走传动系统内

部的空气,保证合成所需惰性气体的条件;二来传动系统受气压反作用力处于半悬空状态,减小电机来回运动时的阻力.然后,步进电机搜寻起点光电开关定原点,待原点确定后,控制系统控制电机运动到第一步合成的位置.此时,电磁阀板的第一列和96孔板的第一列一上一下地对齐.第一步合成完后电机运动到第二步合成位置.第二步合成位置电磁阀板的第一列和96孔板的第二列、电磁阀板的第二列和96孔板的第一列一上一下地对齐.第二步合成完后电机运动到第三步合成位置.如此依次走完第一趟(22步)所有步数后,电机继续向右运动到终点光电开关位置,表示第一趟合成完成,之后再重新回到原点位置等待合成指令.设计原理图如图4所示.

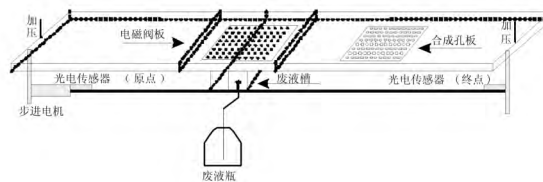


图4 传动系统设计

Fig.4 Transmission system design

3 软件系统设计

系统软件与硬件电路密切结合是实现仪器精确稳

定运行的必要条件.本仪器是集机械自动化、计算机实时状态监控和数据存储分析于一体的系统^[7].要求系统软件完成:用户可以在人机界面的 96 孔板中任意选择并输入需要合成的 DNA 碱基序列、稳定准确执行上位机发出的指令、实时处理收发数据、显示下位机的运行状态同时将与合成进程相关的数据回传给上位机.为此,课题组提出软件系统设计方案.软件系统分为上位机软件系统和下位机软件系统.

3.1 下位机软件系统设计

在主控 STM32 上和步进电机驱动板 TMC351 运行的软件即为下位机软件. STM32 基于 Keil MDK4 的开发环境采用 C 语言编译. TMC351 采用 TMCL 语言开发.下位机软件根据功能可分为以下几大模块.

(1) 参数设定.电机根据负载的情况和运行的速度需要设定其电机的参数.在 TMC351 软件上我们需要设定传动系统步进电机的细分参数、最大加速度、规定正负(正为右方向负为左方向)、电机来回运行的速度等参数.

(2) 归零.仪器上电开始后,程序首先会搜索零点并置零.零点位置的确定说明仪器处于起始状态,零点的确定对后面每一步合成的位置都有决定性的作用.

(3) 定位流程. DNA 合成仪每一趟分为 22 合成步骤,每一个合成步骤都有其具体的位置信息.当步进电机运行到当前合成位置时,下位机会立刻将其位置信息反馈给上位机,然后上位机再发送当前合成步骤电磁阀的开关指令给下位机处理.

(4) 指令处理.下位机在合成过程中会处理上位机发送的三种指令:1)合成开始指令,下位机收到开始指令后会立刻控制电机运动到合成开始位置并把位置信息反馈给上位机;2)电磁阀开关指令,步进电机每到达一次合成位置,上位机会发送相应的电磁阀开关指令,主控会处理这些指令并转换成高低电平信号控制电磁阀开闭和时间;3)合成结束指令,下位机收到后会控制步进电机走到终点位置,表示整个 DNA 合成过程结束.

3.2 上位机软件系统设计

上位机开发基于 LabVIEW 2015 图形化编程开发平台,它由前面板和程序框图组成.前面板用来设置用户需要合成的碱基序列和显示合成步骤.程序框图用于编写和显示程序源代码.

上位机软件设计主要由以下 6 大模块组成:(1)板孔选择:用户可以对 96 孔板任意选定.(2)序列输入:当用户完成对板孔数的选择后,需要对每个已经被选择的板孔进行合成序列输入(合成序列由 A、T、G、C 组

成且每条序列长度不能超过 30).(3)合成进程设置:用户完成输入后,上位机会根据算法生成每一步的电磁阀开关指令.同时会根据步进电机反馈的位置信息来判断合成进程.(4)流程指令存储:DNA 合成仪是分趟数分步骤来合成想要合成的序列,因此需要把还没执行到的指令代码存储起来.(5)串口通信、流程执行模块:用采用 VISA 串口通信的方式,上位机选择串口实现与下位机连接通信,收发指令;流程的开始、结束指令根据下位机反馈的信息来决定.(6)状态监测:上位机会不断根据下位机反馈的信息来监测下位机的运行状况.其上位机控制软件界面如图 5 所示.



图 5 上位机控制软件界面

Fig.5 Upper computer control software interface

上位机软件主要实现以下功能:(1)串口通信功能:依据 485 通信协议经由 USB 转 485 串口与下位机进行通信,上位机实时获取下位机运行状态,同时下位机回传与合成进程相关的数据给上位机.(2)数据处理功能:当用户完成碱基序列输入步骤后,第一步:上位机会提取出所有输入版孔的第一个碱基组成一个新的碱基序列的二维数组,新组成的二维数组每一个元素保留其所在原来输入版孔的行和列信息.再根据下位机反馈的位置信息提取出新组成的二维数组对应的碱基列.到达第一个位置时提取二维数组中含有第一列信息的所有元素并按照一个元素对应固定的十步指令分步骤把开关信息发送给下位机.到达第二个位置时提取二维数组中含有第一列信息和第二列信息的所有元素按照固定算法把开关信息发送给下位机……依次处理完所有信息.上位机根据不同的碱基序列输入,完成对合成序列解析,再分步骤解析出相对应的电磁阀开关指令并发送给下位机.(3)指令的发送:电磁阀开关指令的发送是分趟数分不同位置信息的,趟数由用户最长碱基序列长度决定,第一趟发送的是所有输入版孔中的首个碱基的开关信息.而每一趟又分为 22 步,就说明每一趟有 22 个位置信息,同一碱基不同位置信息会对应不同的开关指令.其上位机软件流程图如图 6 所示.

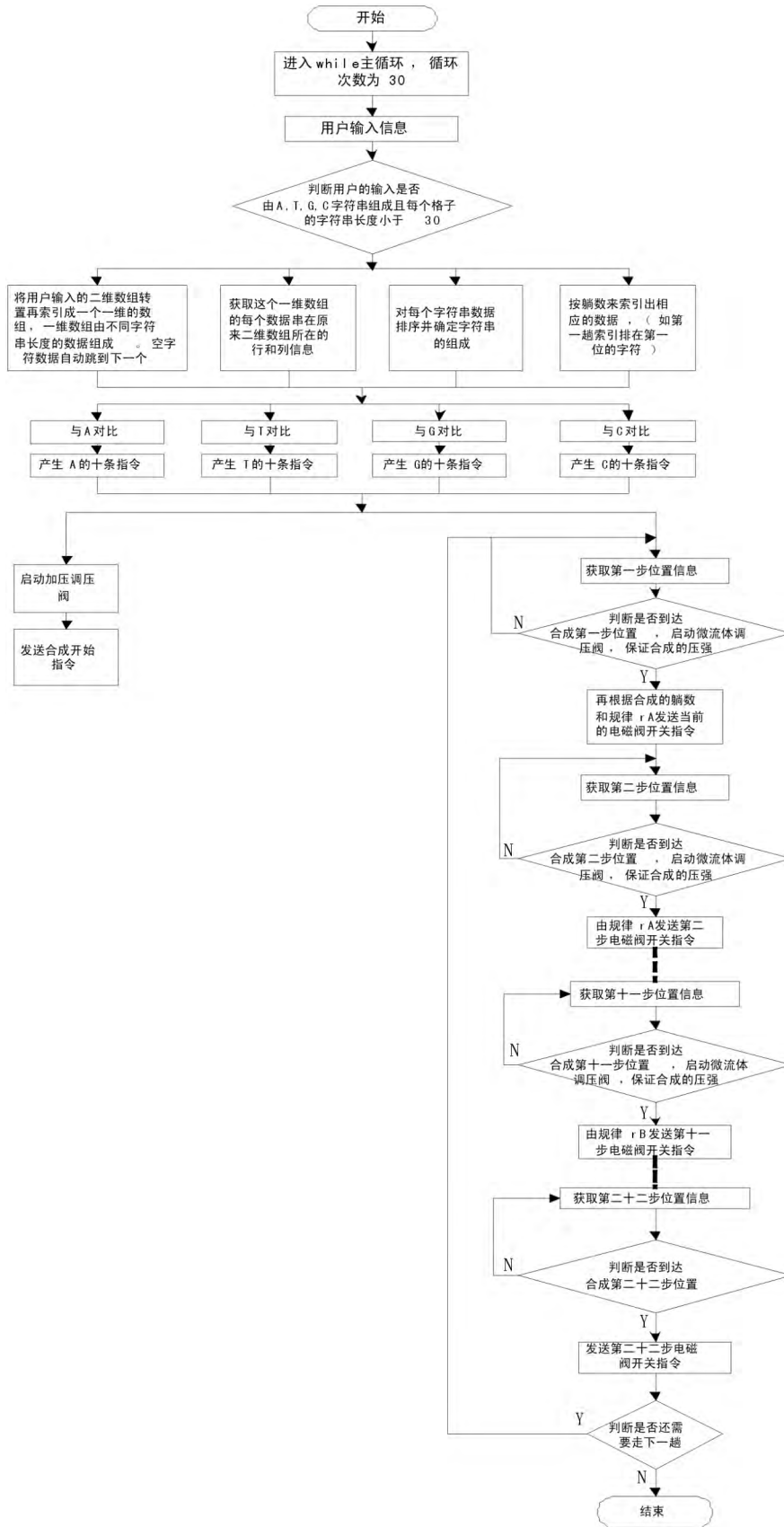


图 6 上位机软件流程图

Fig.6 Upper computer software flow chart

4 结语

本文设计的DNA合成仪控制系统可同时实现96个独立通道的寡核苷酸长链的合成。基于LabVIEW开发的上位机软件功能齐备,操作界面美观友好,数据处理和转换方便。基于STM32开发的下位机高效可靠,对上位机指令处理迅速准确,控制电机和捕获光电开关触发信号及时稳定。由于DNA合成仪的重复工作量大,长时间运行后定位系统的精确度和每次打开电磁阀组排出液体的均一性还需要不断完善。

参 考 文 献

- [1] 邢玉华,谭俊杰,李玉霞等. 合成生物学的关键技术及应用进展[J]. 中国医药生物技术, 2012, 7(5): 357-363.
- [2] 熊燕,陈大明,杨琛等. 合成生物学发展现状与前景[J]. 生命科学, 2011, 23(9): 826-837.
- [3] 冯森,王璐,田敬. 基因合成技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2013, 29(8): 1075-1085.
- [4] 王霞,赵鹏,李炳志等. DNA合成技术及应用[J]. 生命科学, 2013, 25(10): 993-999.
- [5] 高朝辉. 基因合成方法的改进与验证[D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- [6] 梁晓会,黄传伟,郭剑. 多通道高通量DNA合成仪控制系统设计与实现[J]. 军事医学, 2015, 39(8): 571-576.
- [7] 万娟,张莉,张冰洋. 基于TMC6110和LabVIEW的全自动酶联免疫前处理仪的设计[J]. 制造业自动化, 2016, 38(10): 1-6.
- [4] 王朝元,刘亮亮. bHGA对体外培养成骨细胞活性的影响[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2016, 35(2): 31-35.
- [5] 陈思礼,吴汇兰,陈洁. 鱼腥藻PCC7120质粒上毒素-抗毒素基因对 $atr9029/asr9028$ 的初步研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2016, 35(2): 26-30.
- [6] Hynes N E, Lane H A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(5): 341-354.
- [7] Yang J C, Srimuninnimit V, Ahn M J, et al. First-line pemetrexed plus cisplatin followed by gefitinib maintenance therapy versus gefitinib monotherapy in East Asian never-smoker patients with locally advanced or metastatic nonsquamous non-small cell lung cancer: final overall survival results from a randomized phase 3 study [J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(3): 370-379.
- [8] Bellmunt J, Eisen T, Fishman M, et al. Experience with sorafenib and adverse event management [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2011, 78(1): 24-32.
- [9] Boehm S, Rothermundt C, Hess D, et al. Antiangiogenic drugs in oncology: a focus on drug safety and the elderly - a mini-review [J]. Gerontology, 2010, 56(3): 303-309.

(上接第39页)