

基于核酸适体生物传感器的 便携式循环伏安测试系统

姜利英, 胡杰, 陈青华, 王芬芬, 岳保磊

(郑州轻工业学院 电气信息工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要:针对现场电化学测试中电化学工作站携带不便、供电困难等问题,设计了一种基于核酸适体生物传感器的便携式循环伏安测试系统.该系统采用实验室研发制备的核酸适体生物传感器设计了锁定放大电路、恒电位电路及相敏检测程序,可实现微弱信号提取,从而有效克服电路系统噪声.实验结果表明,该系统能实现循环伏安测试,具有较高的信噪比,测试精度达到 $1\ \mu\text{A}$,省电、操作简单,能够满足现场快速准确地进行循环伏安测试的需要.

关键词:核酸适体生物传感器;循环伏安测试系统;锁定放大电路;恒电位电路

中图分类号:TP216 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2014.02.011

A portable cyclic voltammetry measurement system based on aptamer-based biosensor

JIANG Li-ying, HU Jie, CHEN Qing-hua, WANG Fen-fen, YUE Bao-lei

(College of Electric and Information Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Aiming at the problem of inconvenience to carry and difficulty with power in-field electrochemical measurement, a portable cyclic voltammetry measurement system was designed based on aptamer-based biosensor developed by our laboratory. For overcoming the noise in the circuits effectively, a lock-in amplifier, potentiostat and program for phase sensitive detection were designed to extract weak signal. Experiment results showed that the system could implement cyclic voltammetry, which had higher SNR (signal noise ratio), the measurement precision of which could reach $1\ \mu\text{A}$. It had features of power saving, and simple operation, which could meet the requirement of in-field cyclic voltammetry measurement.

Key words: aptamer-based biosensor; cyclic voltammetry measurement system; lock-in amplifier; potentiostat

0 引言

核酸适体是通过生物技术筛选出来,能与目标分子进行特异性结合、具有识别作用的功能化 DNA

或者 RNA 寡核苷酸序列,它具有亲和力强、选择性强、稳定性好、易于修饰等优点,被广泛应用于目标物为蛋白质、小分子等的灵敏度检测.近年来,随着电化学技术的发展,基于核酸适体的电化学传感器

收稿日期:2014-01-12

基金项目:国家自然科学基金项目(61002007);河南省科技创新人才计划项目(124100510001)

作者简介:姜利英(1981—),女,河南省郾城市人,郑州轻工业学院副教授,博士,主要研究方向为生物传感器及检测微系统.

广泛应用于基因诊断、药物检测、环境监测、食品工业、药物筛选等领域,对此类传感器的设计成为研究热点.循环伏安法是一种重要的电化学测试方法,有电化学谱之称,已经广泛应用于无机物和有机物电极过程的研究,以及高分子化学和生物化学中多电子传递过程的表征.它的基本方法是将三角波电压施加在电极上,通过测量电极上流出的电流,记录不同时刻的电压和电流值,并绘出一条 $V-I$ 曲线.目前在实验室进行循环伏安测试普遍使用电化学工作站,这是一种大型多功能电化学测试系统,在实验室中进行各种电化学实验和研究非常方便高效,但在野外考察及现场取样研究中,电化学工作站存在携带不便、供电困难等问题.鉴于此,本文拟结合核酸适体生物传感器的研究进展,针对现场循环伏安检测的需要,以单片机 STC12C5A32S2 为主控芯片,以 HD240128 为显示器,设计一种基于核酸适体生物传感器的便携式循环伏安测试系统,以实现现场循环伏安测试功能.

1 核酸适体生物传感器原理

核酸适体生物传感器由生物识别单元和转换器单元构成,生物识别单元的主要部分是核酸适体,它与目标分析物相互作用使溶液组分发生变化,转换器把溶液组分的变化信息转换成定量的电子信号.核酸适体能与目标分子进行特异性结合,因此搭建电子测量系统来提取核酸适体传感器的信息,能对待测物质进行准确的定性定量检测.笔者所在实验室研究了核酸适体传感器电极的设计加工技术,提出利用薄膜技术在绝缘基材上小批量制备电极等方法^[1].本文利用实验室开发制备的核酸适体生物传感器,设计便携式循环伏安测试系统.

2 测试系统设计

测试系统主要由核酸适体生物传感器、恒电位电路、电流取样电路、锁定放大电路和液晶显示器等组成,框图如图 1 所示. STC 单片机配合 RC 低通电路和电平变换电路生成三角波电压循环施加在核酸适体生物传感器的电极上,通过恒电位电路建立稳定的电势参考点,电流取样电路取出电极上的电流信号,使用锁定放大电路去除信号中的噪声,经 AD 转换后送入单片机,单片机把数字化的激励电压值和电流值组成点的坐标,在液晶显示器上实时绘出循环伏安曲线^[2-3].

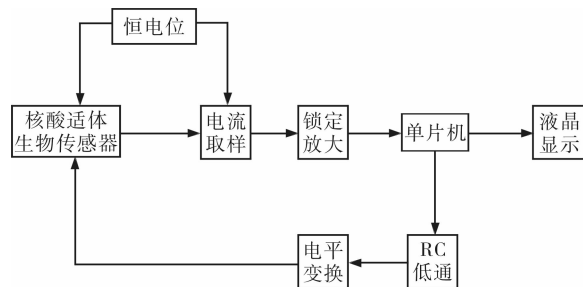


图 1 系统框图

2.1 基于三电极的恒电位电路及电流取样电路

2.1.1 三电极体系 本文采用三电极电化学测量体系,即在工作电极和辅助电极的基础上,附加一个参比电极.工作电极是作为研究对象的电极,研究其上的反应、电流变化等,辅助电极是给工作电极做电流回路而设置的,参比电极为激励电压提供一个稳定的电势参考点.当激励电压施加于工作电极和辅助电极之间时,电极和溶液之间的化学反应导致 2 个电极之间的实际电压并不等于激励电压.故让激励施加在工作电极和参比电极之间,而不直接施加到工作电极和辅助电极之间,通过设计恒电位电路,让工作电极和参比电极之间的电压严格等于施加的激励电压,然后测量从工作电极和辅助电极流出的电流,以保证循环伏安测试是准确的^[4].

2.1.2 恒电位电路及电流取样电路 恒电位电路和电流取样电路如图 2 所示,运放 OP_1 和 OP_2 构成恒电位电路,运放 OP_3 构成电流取样电路.由于溶液并不是完全绝缘的,其阻抗为 $M\Omega$ 级别,而激励电压的存在会导致溶液发生化学反应而使阻抗发生变化.在工作电极 WE 与参比电极 RE 之间,以及参比电极 RE 与辅助电极 CE 之间都用一个可变电阻 R_p 来等效,在运放 OP_1 的反向端加入激励电压 U_{in} ,使 OP_1, OP_2 2 个运放工作, OP_1 接成反向比例放大器,并让反馈电阻和输入电阻相等,则有

$$U_a = -U_{in}$$

OP_1 的反馈回路上的 OP_2 起到了电压跟随器的作用,由此得出

$$U_{RE} = U_a$$

即

$$U_{RE} = -U_{in}$$

OP_3 是电流取样电路,由于后面还要对信号做锁定放大,而且取样电阻过大会导致热噪声严重,所以此处取样电阻选取较小,使用 $100\ \Omega$ 的金属膜电阻.该电路输出信号为

$$U_o = -100I$$

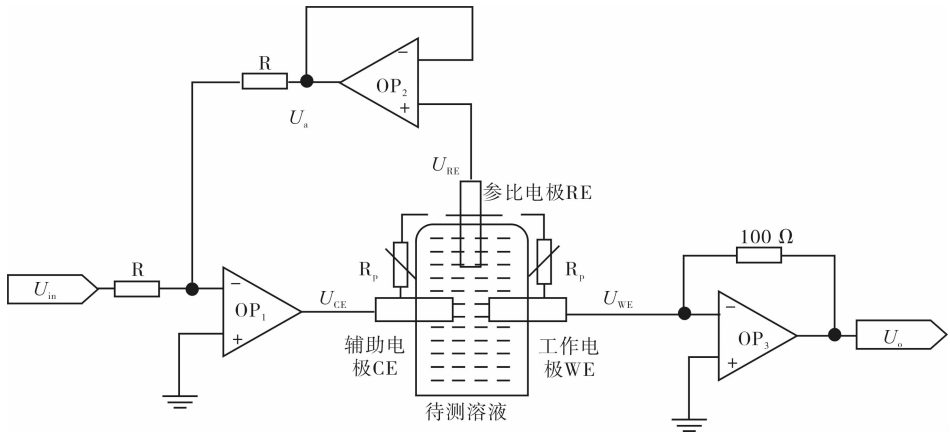


图2 恒电位电路和电流取样电路

同时由于 OP₃ 的同相端和反向端虚地,所以

$$U_{WE} = 0$$

$$U_{WE} - U_{RE} = -U_{RE} = U_{in}$$

即工作电极与参比电极之间的电压严格等于施加的激励电压,从而实现恒电位功能. 采用 SGOP77 超低失调电压运算放大器搭建恒电位系统,其最大输入失调电压仅 25 μV,输入失调电流仅 0.3 nA. 经实验证明,激励电压在 -3.00 ~ 3.00 V 范围变化时,工作电极与参比电极之间电压跟激励电压相差不超过 0.01 V.

2.2 锁定放大电路

2.2.1 锁定放大法原理 锁定放大过程即用调制器将待测微弱直流或缓变信号变换成高频交流信号,对其放大后再解调恢复出原始信号. 该过程滤除了原信号中的低频噪声(1/f 噪声),同时避免了直流通道的直流漂移偏差. 锁定放大去噪原理如图 3 所示,图中虚线是 1/f 噪声和白噪声的功率谱密度,待测信号的频谱在直流(ω = 0)处,其 1/f 噪声尤为显著,利用调制将待测信号频谱搬移到高频后进行选频放大,就不会将 1/f 噪声和低频漂移一同放大,再用相敏解调器(PSD)将其频谱迁移回直流(ω = 0)处,最终用低通滤波器(LPF)滤除噪声,得到高信噪比的放大信号. 锁定放大器框图如图 4 所示,其核心是相敏解调器^[5]. 相敏解调器由乘法器(鉴相器)和低通滤波器构成,其原理框图如图 5 所示,x(t)是调制和 AC 放大后的信号,r(t)是载波信号.

若有

$$x(t) = V_s \cos(\omega_0 t + \theta)$$

$$r(t) = V_r \cos(\omega_0 t)$$

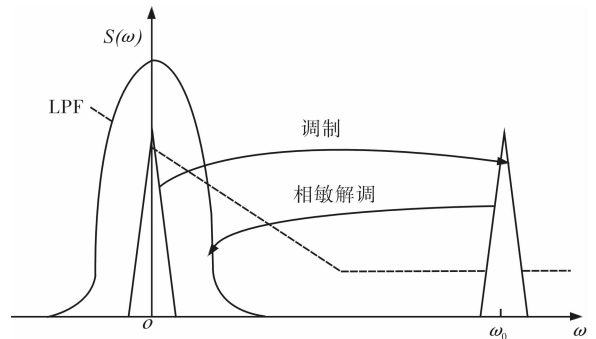


图3 锁定放大去噪原理

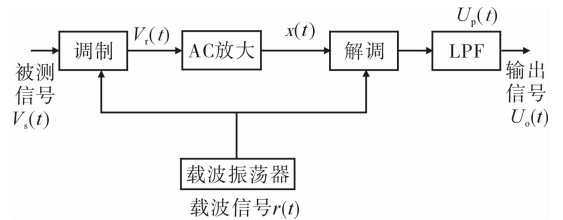


图4 锁定放大器框图

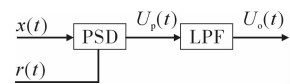


图5 相敏解调原理框图

则经过鉴相器后的信号为

$$u_p(t) = x(t) \times r(t) =$$

$$0.5 V_s V_r \cos\theta + 0.5 V_s V_r \cos(2\omega_0 t + \theta)$$

该信号经低通滤波器后将和频分量滤除,得到输出为

$$u_o = 0.5 V_s V_r \cos\theta$$

该输出不仅正比于待测信号的幅度,而且正比于调制信号和参考信号的相位差,在 θ = 0 时,输出达到最大值,并能恢复出待测信号,其幅值为

$$V_s = 2 \frac{u_o}{V_r}$$

2.2.2 电路设计 实现锁定放大的主要电路如图6所示. 由AD9833和STC单片机构成的直接数字频率合成(DDS)正弦波信号发生器可以提供载波, 为避开低频(1/f)噪声并兼顾带通滤波器MAX7490的中心频率范围(0.001~40 kHz), 选取该正弦载波频率为10 kHz. 模拟乘法器AD633将被测信号和该载波相乘, 实现调制功能, 再经MAX7490和SGOP77实现选频放大, 由AD633再次和载波相乘实现相干解调, 输出经8阶开关电容椭圆低通滤波器MAX7400得到放大的高信噪比被测信号. 由于用乘法器AD633而不是专用的相位检测器来进行解调, 所以还需要对解调得到的信号进行软件处理才能最终实现相敏解调. 从MAX7400得到的信号送入STC单片机的AD输入口(P_{1.7})形成数据, 经软件处理后找出相位差为0的待测信号值, 最终实现相敏检波功能.

图6中左侧AD633将待测信号频谱的中心频率搬移到10 kHz处, MAX7490是4阶开关电容滤波器, 它被设置成带通滤波器的形式, 带通滤波的中心频率取决于其外部时钟频率, 两者关系为

$$\text{中心频率} = \text{时钟频率} / 100$$

故选取1 MHz有源晶振接在AD9833的MCLK输入管脚上, 得到带通滤波中心频率为

$$f_0 = 1M / 100 = 10 \text{ kHz}$$

从而选出需要放大的信号. 右侧AD633将放大后的调制信号频谱搬移回直流处, 经MAX7400进一

步提高信噪比, MAX7400能实现的低通滤波截止频率范围是1~10 kHz, 与MAX7490类似, 其截止频率 f_c 由时钟CLK决定, 即

$$f_c = \frac{clk}{100} \tag{1}$$

当CLK管脚接外部有源晶振时, MAX7400使用外部时钟源; 当CLK管脚通过电容接地时, MAX7400使用内部时钟源, 振荡频率 clk 由电容 C /pF的大小决定:

$$clk = \frac{38 \times 10^3}{C} \tag{2}$$

文中使用内部时钟源, 取 $C = 10 \text{ pF}$, 由①②两式得

$$f_c = 38 \text{ Hz}$$

该截止频率能较好地滤除调制和解调过程中引入的高频噪声, 锁定待测信号频带, 得到的信号经AD转换后送入单片机做软件处理, 判断出相位零点, 并还原出真正的待测信号值.

2.3 软件设计

2.3.1 系统软件结构 单片机控制整个工作流程, 并负责生成三角波和处理采样数据以实现相敏解调, 正弦载波和AD转换都通过配置专用芯片或专用寄存器得到^[6]. 系统软件流程如图7所示.

2.3.2 相敏解调的软件实现 由前述相敏解调原理可知, 调制信号和载波相位差等于0时, 解调得到的信号达到最大值. 通过程序控制, 在每个载波周期内采样锁定放大器的输出信号, 得到大量数据, 程序通过比较算法找出这些数据在该载波周期内

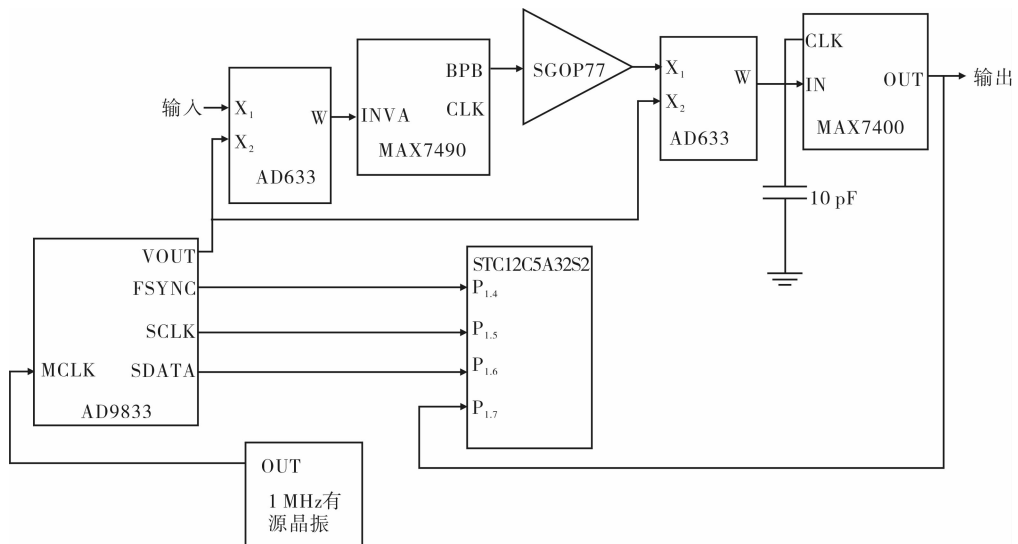


图6 锁定放大电路

的最大值,再依据取样电路和锁定放大电路中运放的总放大倍数,即可换算出待测电流值,实现相敏解调.相敏解调软件流程与比较算法流程如图8所示.

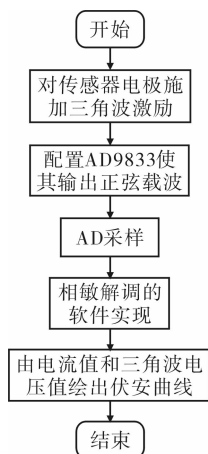


图7 系统软件流程图

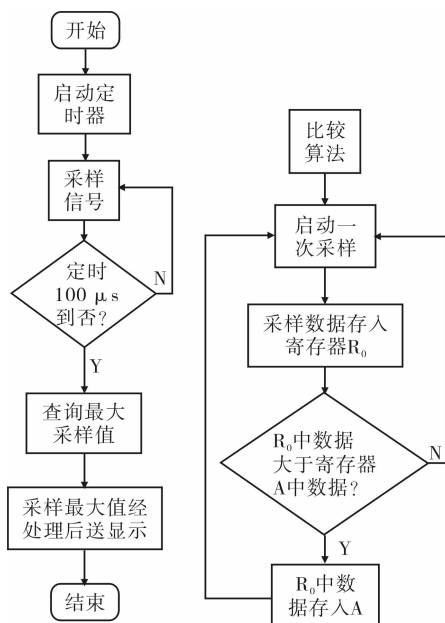


图8 相敏解调软件与比较算法流程图

2.3.3 三角波、正弦载波和实时显示 三角波是通过设置STC单片机的脉冲宽度调制(PWM)功能寄存器生成一定占空比的PWM脉冲波形,通过占空比延时循环改变让该PWM波经RC低通滤波器和比例运放得到的.比例运放的同相端接1V恒定电压,构成电平变换器,让三角波可以双向电位扫描.改变延时可以改变扫描速度,改变占空比大小可以改变电压幅度.

通过配置DDS芯片AD9833的频率寄存器可生

成10 kHz的正弦载波,AD9833与单片机之间使用串行外设接口(SPI)总线协议进行通信,其频率控制字计算公式为

$$M = f_{\text{out}} \times 2^{28} / f_{\text{CLK}} \quad (3)$$

文中外部时钟频率是1 MHz,需要输出10 kHz正弦波,代入③式计算出频率控制字为28F5C2,将其按照先低14位、再高14位的顺序写入AD9833的频率寄存器,并设置控制寄存器的模式位使其输出正弦波即可.编写程序时注意SPI协议对通信时序的约束.

使用T6963控制器的液晶显示器HD240128制伏安曲线,T6963是按照字节(8个像素点)来分配地址的,每个地址控制8个像素点,所以只能直接操作8点的像素集合而不能直接操作单独的像素点,需要先设计一个画点函数,以实现像素点的任意操作.为适应HD240128的屏幕大小,还需将测量数据缩小一定倍数再予以显示^[7].

3 系统验证

3.1 锁定放大性能测试

采用实验室制备的核酸适体生物传感器,在其电极上滴加50 mmol/L的铁氰化钾溶液进行循环伏安测试,并设置三角波扫描范围是-0.5~0.4 V,初始电位是-0.5 V,扫描速度为0.05 V/s,扫描段数是2.

通过在电路板上设置跳线以及改写相应的处理程序,让信号分别经过普通放大电路和锁定放大电路,并让两者放大倍数相同,分别测试使用2种放大电路的结果如图9所示.由图9可见,使用锁定放大电路及软件相敏解调后,系统较好地抑制了低频噪声和电阻热噪声,信噪比相对于普通放大电路提高了10 dB左右,说明较为准确地提取出了待测信号.

3.2 本系统和电化学工作站循环伏安测试曲线的对比

使用相同的核酸适体传感器,并设置三角波扫描范围是-0.5~0.4 V,初始电位是-0.5 V,扫描速度为0.05 V/s,扫描段数是2.在电极上滴加50 mmol/L的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液,分别用本系统和电化学工作站CHI660进行循环伏安测试.清洗电极后,滴加25 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液,再分别用2种系统进行循环伏安测试,结果如图10所示.

由图10可知,该系统相较于CHI660电化学工作站在抗噪性能上还是有一定差距的,以CHI660为

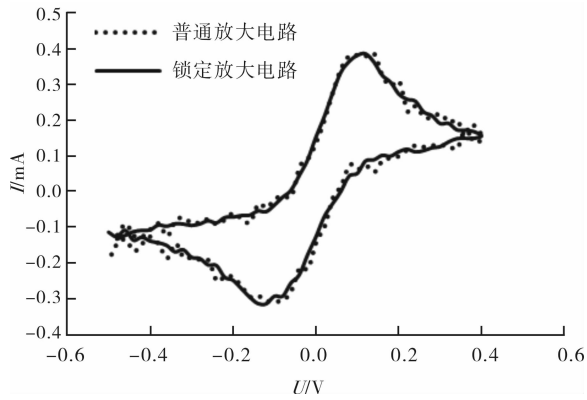


图9 锁定放大电路和普通放大电路测试结果对比

标准数据,本系统数据的平均相对误差小于1%,平均绝对误差小于 $1 \mu\text{A}$,而CHI660的精度是 1 pA ,远小于 $1 \mu\text{A}$,故本系统的测试精度在 $1 \mu\text{A}$ 以内。

由 25 mmol/L 和 50 mmol/L 溶液的测试曲线对比可以看出,该系统虽然信噪比和测试精度低于电化学工作站,但也能较为准确地反映出循环伏安曲

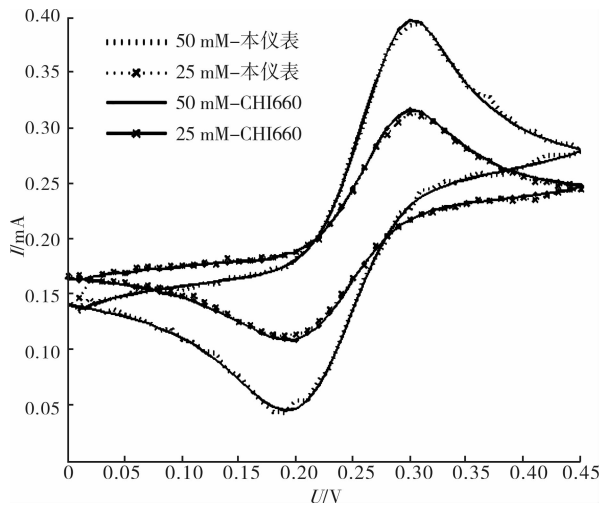


图10 本系统和CHI660电化学工作站测试结果对比

线的峰值随溶液浓度变化的情况.借助核酸适体生物传感器,对于科研人员现场分析特定物质的浓度有一定意义。

4 结论

本文针对现场电化学测试中电化学工作站携带不便、供电困难等问题,设计了一种基于核酸适体生物传感器的便携式循环伏安测试系统.经过反复实验,证明该系统可以快速、准确地实现循环伏安测试,且具有较高的信噪比,测试精度达到 $1 \mu\text{A}$,配合核酸适体生物传感器可以分析不同浓度溶液的循环伏安曲线,轻便省电.该系统在环境考察和现场电化学检测中具有明显的优势和很好的应用前景。

参考文献:

- [1] 刘腾飞,杨代凤,邓金花,等.核酸适体的筛选制备及分析应用[J].生物技术通报,2013(4):40.
- [2] 罗兰英,田学隆,周平,等.心电电极除颤过载恢复性能测试系统[J].仪器仪表学报,2011,32(9):1982.
- [3] 冯巧玲,裴永占.电子式电流互感器数据采集系统的设计[J].郑州轻工业学院学报:自然科学版,2013,28(3):83.
- [4] 朱健铭,陈真诚,金星亮,等.基于DSP技术的便携式无创血糖检测仪[J].电子测量与仪器学报,2009,23(6):108.
- [5] 姚毓升,解永平,文涛.三电极电化学传感器的恒电位仪设计[J].仪表技术与传感器,2009(9):23.
- [6] 王俊.电化学分析系统中 $\text{pA} \sim \mu\text{A}$ 微电流测量[J].电子测量与仪器学报,2011,25(11):972.
- [7] 马忠梅.单片机的C语言应用程序设计[M].北京:北京航空航天大学出版社,2003.