

聚合酶連鎖反應系統晶片

Polymerase Chain Reaction System Chip

刁宥升，許孟烈，王俊太，陳志嘉，童世勳，盧志文

國立暨南國際大學 電機工程學系

sheu@ncnu.edu.tw,

聚合酶連鎖反應技術 (Polymerase Chain Reaction Technology ; PCR) 被廣泛地應用在 DNA 分析生物科技領域中，本篇論文將 PCR 系統中包含溫度感應、加熱、信號處理轉換電路等單元利用 TSMC CMOS 0.35 μ m 1P4M 製程技術進行晶片設計與製作，並利用現場可程式化邏輯閘陣列 (FPGA) 晶片設計系統控制單元以構成一具有極小體積與快速反應優點的 PCR 系統。

1 前言

PCR 原始雛型概念是類似基因修復複製(DNA Repair Replication)，於 1971 年由 Dr. K. Kleppe 所提出的一個單純且短暫性基因複製的實驗[1]。而現今所使用的 PCR 則是由 Dr. K. B. Mullis 於 1983 年發展出來的[2]。PCR 能將少量的 DNA 由少變多，他的應用範圍極廣，包括臨床醫學、遺傳疾病診斷、病毒感染偵測、分子演化學等方面。

PCR 系統目前的發展方向是朝向微小化、自動化、微反應室[3]。目前在國內的相關研究有：如採用遠紅外線非接觸式加熱方法，配合強制冷卻實現 DNA 複製所需之快速加溫 (25°C/sec.) 與降溫 (10°C/sec.) [4]，其控制部分則利用傳統 PID 控制方式、利用微機電製程之微影技術、非等向性濕式蝕刻技術在 <100> 4 吋矽晶片上製作寬深分別為 1mm、150 μ m 的 DNA 複製反應槽，矽晶片和經切割之 Pyrex 玻璃與超音波鑽孔後進行陽極接合完成聚合酶反應晶片；還有結合熱循環模組及螢光偵測系統，完成 DNA 放大與即時偵測機構[5]，其熱循環模組硬體架構

部分以個人電腦為基礎，溫度偵測系統採用 T-type 熱偶溫度感應器與相關配合介面卡。

本論文為達晶片實驗室 (Lab on a Chip) 微小化目標，選用國內成熟之 Silicon CMOS 技術，將 PCR 反應系統適當切割為數部分個別進行設計，最後將整合為一 PCR 反應系統晶片。

2 方法

2.1 PCR 原理

聚合酶連鎖反應(PCR)是一個複製 DNA 的簡便而有效的方法，簡單地說，PCR 就是利用酵素對特定基因做體外或試管內的大量合成。基本上它是利用 DNA 的合成酵素進行專一性的連鎖複製。

目前常用的技術，可以將一段基因複製為原來的一百億至一千億倍。圖 1 為 PCR 的基本流程圖：(A) 雙股的 DNA 經加熱後成為單股的 DNA、(B) 單股的 DNA 被 Primers (圖 1B 的 2 個小方塊) 經 Annealing 的步驟而連接於各別股的一端、(C) Primers 經 extension 的步驟依箭頭的方向進行延長合成反應、(D) 經由前述三個步驟後，一份的雙股

DNA 就變成兩份的雙股 DNA。如此的周期一再重覆就會使得原來的特定 DNA 得以連鎖複製。

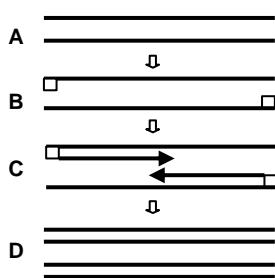


圖 1: PCR 的基本流程圖

PCR 操作過程為一重複的熱變化循環 (Cycle)，如圖 2 主要分成三大部份：(一)以高溫(92 -95)使雙股模板 DNA 分離(denature)，(二)使引子與單股模板 DNA 做緩冷配對(40 -52)，(三)再將溫度調整到 DNA 聚合酵素作用的有效溫度而合成新的 DNA 股。

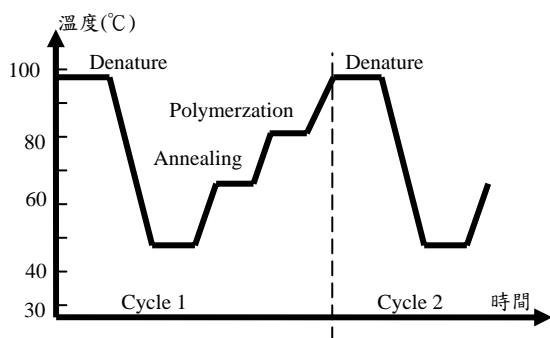


圖 2: PCR 反應程序

目前 DNA 分析系統在使用上不但耗時、耗人力，因而成本大幅提高。因此許多研究單位紛紛利用積體電路微小化的技術投入發展 PCR 系統，因為微小化可改進 PCR 系統反應機制，以少量 DNA 與藥劑進行快速反應，不但可節省時間與藥劑的使用，更可達到均勻加熱與快速溫度變化，因此可以大大降低成本。

2.2 提出的 PCR 系統架構

為了能使 PCR 系統微小化，本論文

選用標準的 Silicon CMOS 0.35 μm 半導體製程，進行晶片的設計與製作。

初步為能個別進行測試，我們提出如圖 3 的 PCR 系統架構，並將整個系統分成 3 個晶片：第一個晶片具有感應器與加熱器的微反應室，第二個晶片是感應器信號處理與轉換電路與加熱器驅動電路，第三個晶片為系統控制用的 FPGA 晶片。

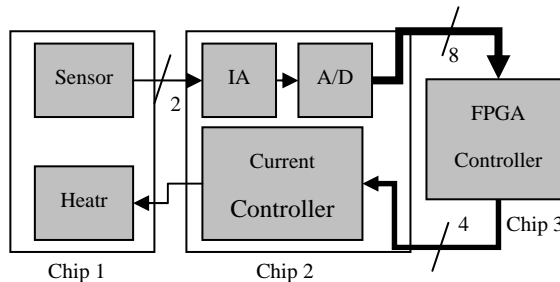


圖 3: PCR 系統

3 晶片製作

PCR 系統中的四個單元：感測與加熱器、儀器放大器 (IA)、類比至數位轉換器、系統控制器，我們依 ASIC 及 FPGA 設計方式進行設計，其中 ASIC 部分則透過國科會國家晶片系統設計中心 (CIC) 所提供的 TSMC CMOS 0.35 μm 1P4M 製程實現且驗證完成。

3.1 感測與加熱器

加熱和溫度感測器是使用 poly 和 NW-diffusion 的材質，為了了解製程偏差所造成的實際量測與理想的電阻值之間的誤差，以及在晶片上熱與距離的關係，我們分別使用四種不同的電阻值的 poly 和 NW-diffusion 電阻，量測熱傳導的關係，圖 4 是佈局圖。圖 5、圖 6 分別為 NW-diffusion 和 poly 電阻對溫度 25°C~110°C 的變化。NW-diffusion 電阻比 poly 電阻具有較大的 TCR，適合作為熱敏電阻的材料。而 poly 電阻具有很小的 TCR，所以適合做為加熱器。

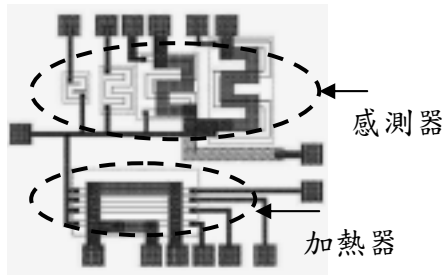


圖 4: 感測與加熱器 Layout Size 300 μm×500μm

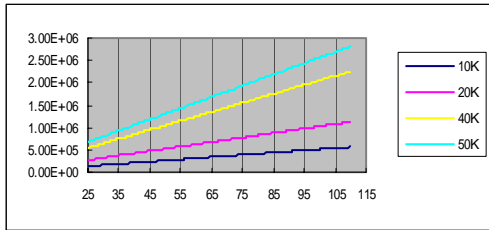


圖 5: NW-diffusion 溫度與阻值關係

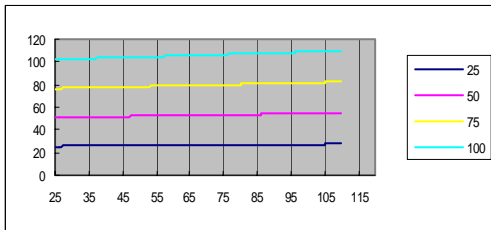


圖 6: poly 溫度與阻值關係

3.2 儀器放大器

儀器放大器使用一個 Rail-to-Rail 架構之 Operational Amplifier，此 OPAMP 如圖 7 所示，主要由(1)Bias Current (2) Rail-to-Rail Input Stage (3) Output Gain Stage 所組成。Rail-to-Rail Input Stage 是由 NMOS Differential Pair 和 PMOS Differential Pair 所組成，而 Output Gain Stage 是 Class AB Output Stage 型式，以獲得較大的增益，圖 8 是實際佈局圖，圖 9 為晶片完成後的功能量測，表 1 為測試結果。

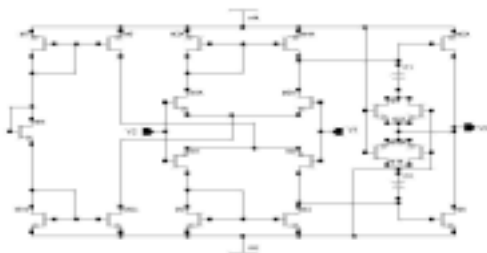


圖 7: Rail-to-Rail Operational Amplifier 之電路圖

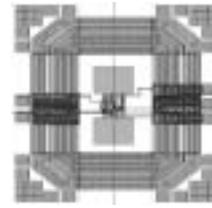


圖 8: IA-Layer Layout Size 300μm× 500 μm

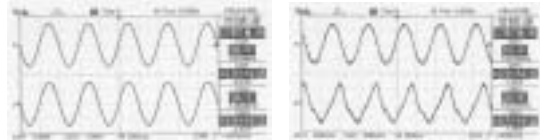


圖 9: Output Swing 與 Unity-Gain Bandwidth 之量測波形

表 1: 量測結果

規格項目	預計規格	實測結果
Power	±1.5V	±1.5V
Open Loop Gain	108dB	100dB
Unity-Gain Bandwidth	1.2MHz	1.06MHz
Output Swing	-1.2V~1.2V	-1.45V~1.45V
Offset Voltage	<10mV	33.75mV

3.3 類比至數位轉換器

類比至數位轉換器 (Analog to Digital Converter, ADC) 使用快閃式 (Flash) 的架構，為了縮小類比電壓值和數位值的誤差，增加其準確度，此處的 A/D Converter 是一個 8-bit 數位輸出值，更在其中運用了兩階式 (Two-Step) 的架構，以減少其電路的複雜度與晶片面積。其電路架構如圖 10 所示。圖 11 為輸入的類比信號電壓值與輸出的數位轉換成十進制值的關係圖，圖 12 是佈局圖。

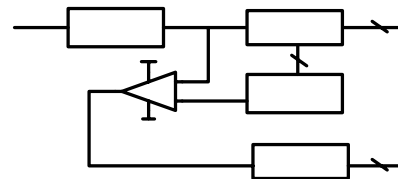


圖 10: Flash A/D Converter 架構圖

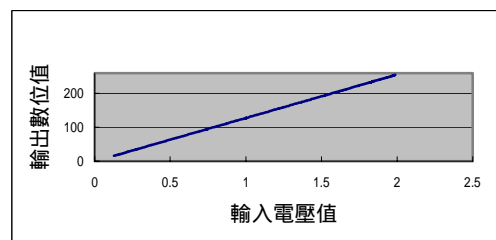


圖 11: A/D Converter 輸入與輸出關係圖

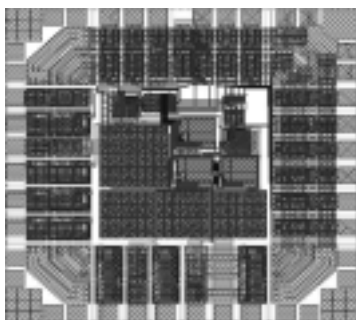


圖 12: A/D Layout t Size 0.7mm× 0.7mm

3.4 系統控制器

系統控制器則是利用 ALTERA FLEX10K Chip 透過 MAX+PLUS II 應用軟體，所設計的八位元四管線式微控制器，可使用的 16 個指令如表 2 所列。微控制器設計分為兩部分：資料處理管線結構與控制系統，資料處理是負責微控制器內部資料運作與流程，而控制系統處理執行程序和 I/O 運作。系統控制則透過所撰寫的控制程式來監控進行，限於篇幅在此不討論控制程式。

表 2: 微控制器指令集

指令碼	指令	指令碼	指令
0000	NOP	1000	ADD
0001	RET	1001	SUB
0010	JUMP	1010	AND
0011	CALL	1011	OR
0100	JZ	1100	IADD
0101	JNZ	1101	ISUB
0110	JC	1110	IAND
0111	JNC	1111	IOR

4 結論

聚合酶連鎖反應技術被廣泛地應用各類的生物科技之中，而成熟的半導體技術使我們能將 PCR 系統整合於晶片上以便發展出微小化與更好執行效能的系統。

在本論文中，我們已經完成一個 PCR 系統中個別主要單元電路的設計與製作，量測結果證明是可行的，因此未來我們將把系統控制器、儀器放大器、類比至數位轉換器三個單元整合並實現於一

顆晶片內，而感測器與加熱器部分則須克服溫度變化對電路的不良影響，才可以考慮整合在同一晶片內的可行性。

5 參考文獻

- [1] Kleppe, K.E. Studies on polynucleotides XCVI: repair replication of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA Polymerases. J. Mol. Biol. 56, 341. 1971
- [2] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim, "Enzymatic Amplification of β - Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia," SCIENCE, Vol. 230, 1985, pp13 50-1354.
- [3] Schabmueller, C.G.J.; Lee, M.A.; Evans, A.G.R.; Brunnschweiler, A.; Ensell, G.J.; Leslie, D.L. "Closed chamber PCR chips for DNA amplification", Engineering Science and Education Journal, Volume: 9 Issue: 6, Dec. 2000, pp259-264.
- [4] 詹永吉, "微晶片聚合酶反應器溫程控制之設計與建立", 國立成功大學工程科學系, 民國八十九年六月。
- [5] 鍾明達, "原位偵測聚合酶連鎖反應", 國立成功大學工程科學系, 民國九十年六月。

6 誌謝

感謝國科會專題計畫 NSC-90-2215-E-260-001 經費補助，感謝國家晶片系統設計中心提供晶片製作與測試。