

# Termociclador de Bajo Costo para Amplificar DNA Mediante Técnica de PCR en Microdispositivos.

Erwing Bahena-García<sup>1,2</sup>, José L. García-Cordero<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional., México D.F., México.

<sup>2</sup>CINVESTAV-Monterrey, Parque PIIT, Nuevo León, México.

**Resumen**— Presentamos el diseño, integración y construcción de un termociclador de bajo costo para implementar la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés) en dispositivos microfluidicos. El termociclador consiste en una resistencia de baja potencia como calentador y un ventilador de computadora como disipador. Los ciclos de temperatura se lograron programando un control PID (Proporcional-Integral-Derivativo) en comunicación serial con el microcontrolador Arduino UNO desde una computadora mediante la interfaz de LabVIEW. A través de pulsos PWM se logró regular la caída de voltaje en el calentador y el disipador para obtener la temperatura deseada. Para monitorear en tiempo real la temperatura se utilizó un termopar tipo-K acondicionado a una entrada analógica del mismo microcontrolador. Se da una revisión de los componentes electrónicos utilizados y se presenta la interfaz diseñada para el control de tiempos y temperatura que se necesitan en la técnica de amplificación del DNA. Demostramos que con estos componentes podemos implementar los ciclos de temperatura necesarios para la técnica de PCR. Una ventaja de nuestro sistema es que está hecho de instrumentación electrónica de muy bajo costo lo que permite que otros laboratorios puedan implementarlo sin muchos conocimientos de electrónica.

**Palabras clave**—Termociclador, PCR, microdispositivo.

## I. INTRODUCCIÓN

Los termocicladores son dispositivos que permiten programar ciclos de temperatura para realizar procesos que necesitan una dinámica de calentamiento y/o enfriamiento. Un ejemplo es la técnica de PCR que consiste en amplificar un fragmento de DNA, denominado templado, con la ayuda de una polimerasa (enzima que permite sintetizar cadenas de DNA) durante períodos de tiempos a diferentes temperaturas. Esencialmente son tres las etapas que conforman un ciclo de PCR, y el número de ciclos dependen del tamaño del templado que se desea amplificar [1]. En la etapa de desnaturalización la temperatura se eleva a 93-96 °C por 15-30 s. para lograr la separación de la doble hélice del DNA a fragmentos monocatenarios. La temperatura luego desciende a 58-65 °C por 15-30 s. para la etapa de alineación en donde las cadenas simples de DNA se unen con oligómeros que fungirán de cebadores para que la polimerasa tenga una señal de inicio. Finalmente la temperatura aumenta a 72 °C<sup>1</sup> por 30-45 s para que la

enzima polimerice los dNTP's (desoxirribonucleótidos trifosfato) y genere dos cadenas dobles de DNA. El ciclo se repite definitivamente hasta amplificar en 2<sup>n</sup> el templado inicial, en donde n es el número de ciclos [1,2].

Actualmente los termocicladores comerciales tienen la desventaja de tener elevados precios de adquisición y de tener grandes dimensiones. Sin embargo, con el avance en el campo de la microfluídica ha sido posible reemplazar los tubos de microcentrífuga o placas de pozos (donde convencionalmente se lleva a cabo la PCR) por microdispositivos que contienen volúmenes más pequeños (del orden de nL) lo que permite consumir menor cantidad de reactivos y por lo tanto, reducir los costos de operación.

Se han reportado diferentes microdispositivos que utilizan tecnología Peltier o conductores de bajo punto de fusión que si bien proveen un diseño compacto y fácil funcionamiento, poseen un elevado costo y una fabricación compleja que limita su aplicabilidad [3, 4, 5].

El objetivo de este trabajo fue diseñar y construir un termociclador de bajo costo para implementar la técnica de PCR en dispositivos de microfluídica. Aquí demostramos que una resistencia de baja potencia (5 W), Fig. 1, puede ser usada como un calentador y puede alcanzar temperaturas necesarias para llevar a cabo un PCR. La resistencia se enfría usando tan sólo un ventilador de computadora. Para controlar la temperatura de la resistencia implementamos un controlador PID. También mostramos la construcción de un contenedor portátil donde embutimos el ventilador, una placa Arduino y la electrónica de potencia.

## II. METODOLOGÍA

Para generar los ciclos de temperatura se utilizaron tres fases.

- 1) *Actuación*: Se usó una resistencia de baja potencia como calentador y un ventilador para enfriar la resistencia. Como lo indica el esquemático de la Fig. 2, se usaron transistores Darlington NPN TIP 122 conectados a la resistencia de calentamiento y al disipador para regular el voltaje suministrado. Con la corriente de base en conexión a la salida PWM (modulación por ancho de pulso, por sus siglas en inglés) de un microcontrolador Arduino Uno se controló el valor de dicho voltaje. Se utilizó instrumentación de fácil adquisición y bajo valor comercial y se montó sobre una placa perforada para circuitos electrónicos.
- 2) *Comparación*. Para medir la temperatura se acondicionaron termopares Tipo-K con un

<sup>1</sup>Generalmente considerada la  $T_{max}$  de la polimerasa pero puede variar dependiendo del tipo que se utilice.

amplificador operacional en configuración no inversora. Se usó un circuito LM324N alimentado con 12 V DC. Se seleccionaron la resistencias de forma que la ganancia de amplificación fuera aproximadamente igual a 1000 de acuerdo con la ecuación:

$$V_0 = \left(1 + \frac{R_8}{R_7}\right) \cdot V_i \quad (1)$$

La señal de salida del amplificador se alimentó a una de las entradas analógicas del microcontrolador. Internamente el Arduino tiene un convertidor analógico digital (ADC) que transforma la señal a un valor binario y permite su manipulación para obtener una magnitud de voltaje. Posteriormente calibramos dos termopares para poder ajustar una relación entre temperatura y voltaje, Fig. 3. Esto se realizó midiendo el descenso de agua ultrapura previamente calentada.

- 3) **Control.** Se implementó un controlador PID desde una computadora para accionar el sistema calentamiento/enfriamiento en base a pulsos PWM que controla el nivel de voltaje que cae tanto en la resistencia como en el ventilador para establecer la temperatura deseada, Fig. 4. El controlador PID estuvo integrado por las tres acciones que lo definen. La acción proporcional permitió reducir los tiempos de subida y bajada, la acción derivativa evitó el sobretiro dado por la acción proporcional y la acción integral eliminó el error de estado estacionario. En cada acción se creó una ganancia para la generación de los ciclos de temperatura en el termociclador.

La programación del controlador PID y del protocolo de comunicación entre la computadora y la placa Arduino se realizó en LabView.

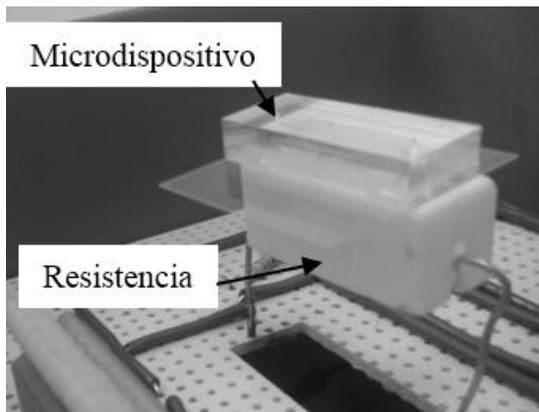


Figura 1. El calentador consiste en una resistencia de baja potencia que se calienta al aplicar un voltaje.

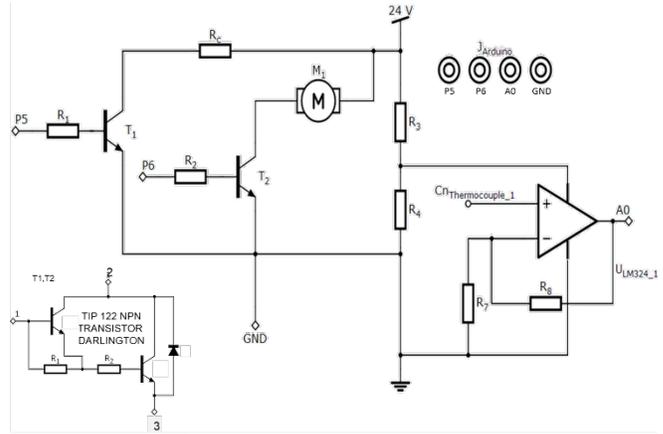


Figura 2. Esquemático del circuito diseñado para el desarrollo del termociclador.

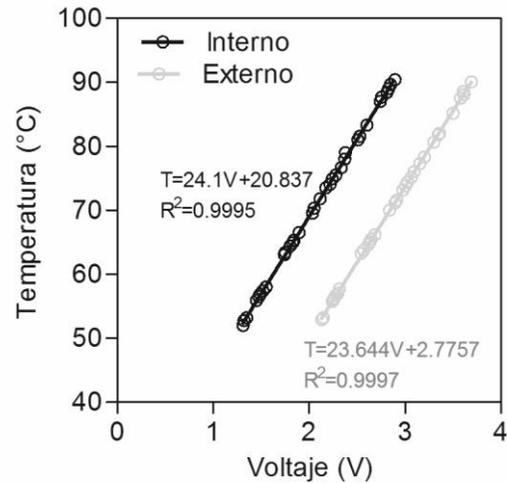


Figura 3. Curva de caracterización para dos termopares usados en la medición de temperatura.

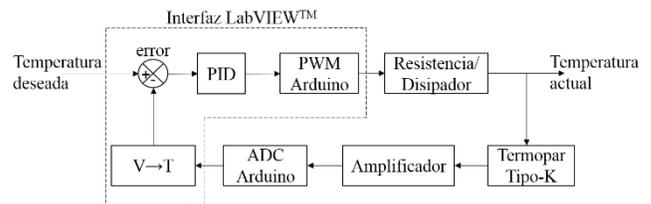


Figura 4. Diagrama a bloques del sistema implementado para el control de los ciclos de temperatura.

### III. RESULTADOS

Las lecturas de los ciclos de temperatura generados por el sistema se muestran en la Fig. 5. Estos ciclos fueron programados en tiempo y temperatura; 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 45 s. Se obtuvo una velocidad de calentamiento y enfriamiento de aproximadamente 2 °C/s.

La Fig. 6 muestra el diseño de un contenedor para el desarrollo del microdispositivo que permita llevar a cabo la técnica de PCR en chips de microfluidica. La caja se diseñó

en el software AutoDesk AutoCad y fue impreso en una 3D Printer MakerBot Replicator 2. Los chips fueron diseñados con un elastómero de PDMS y fijados en un cubreobjetos [6].

La tabla 1 muestra una relación de los diferentes componentes usados para la instrumentación electrónica.

Para  $R_7$  y  $R_8$ , usando (1) el coeficiente de amplificación que se obtuvo fue de (usando el valor de resistencia medido):

$$V_0 = \left(1 + \frac{9870 \Omega}{10.1 \Omega}\right) \cdot V_i = 978.22 \cdot V_i$$

#### IV. DISCUSIÓN

Como muestra la fig. 3, la calibración de los termopares se ubicó en el rango de temperaturas a las que es posible llevar las fases de un ciclo PCR. El control de temperatura reside sobre el termopar ubicado en la resistencia de calentamiento, de esta forma se introdujo un termopar dentro del microcanal para corregir la temperatura del primero por pérdidas en la transferencia de calor. La presencia de ruido en las lecturas analógicas se eliminó colocando capacitores de tantalio dando mejor resolución a los datos de entrada. La alimentación del sistema fue designada a 24 V DC y 1.5 A, utilizando un eliminador para accionar el termociclador. Sin embargo, se toma en cuenta el hecho de implementar una propia fuente de alimentación para conectar en forma directa a un contacto común.

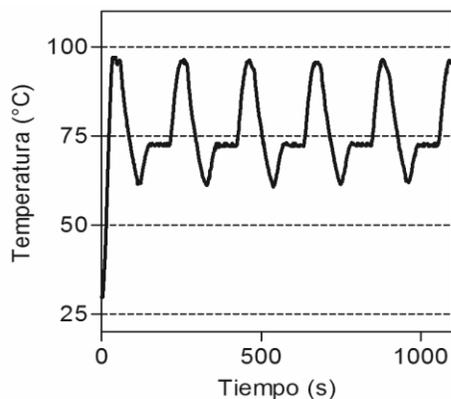


Figura 5. Ciclos de temperatura ajustados para la técnica de PCR. La lectura proviene de un termopar pegado a la resistencia.

TABLA I  
RELACIÓN DE COMPONENTES UTILIZADOS PARA EL MICRODISPOSITIVO

Cantidad	Componente	
	Nombre	Tipo
1	Placa Arduino®	UNO
2	Transistor Darlington	TIP 122
1	Motor disipador	
4	Cables Jumpers	
1	Amplificador Operacional	LM324N
1	Termopar	Tipo-K
4	Resistores	½ W
3	Resistores	5 W
1	Contenedor	

Se observó una ligera variación del voltaje de salida entre las 4 diferentes unidades del amplificador operacional integrado, así como una diferencia entre distintos componentes utilizados, razón de que se calibraran individualmente cada termopar. La ventaja de utilizar el LM324N es su versátil alimentación de sólo un potencial comparada con otros amplificadores que necesitan tanto un potencial positivo como un potencial negativo. Es posible utilizar otro tipo de termopares acondicionando su entrada y realizando la respectiva calibración.

Se adaptaron los chips de microfluídica al tamaño de la resistencia de calentamiento, esto otorga la ventaja de disminuir la cantidad de reactivos de consumo comparado con la técnica tradicional donde se usan tubos de microcentrífuga. El microcanal interno se encuentra completamente aislado evitando cualquier tipo de contaminación durante el proceso. En este punto el uso de un cubreobjetos maximiza la transferencia de calor hacia la muestra que contiene los reactivos de la PCR dado su delgado grosor (a diferencia de un portaobjetos o tubos contenedores de muestras), procurando que la temperatura entre ésta y la resistencia calefactora coincidan paralelamente. En todo caso, la existencia de algún gradiente se eliminó ajustando la lectura del segundo termopar (colocado internamente) con el localizado en el calefactor.

Es posible crear un gran número de combinaciones de ciclos de tiempos y temperaturas sin tener que cambiar de microdispositivo. Diseñamos y programamos una amigable interfaz que permite escoger magnitud de tiempo y temperatura acorde al tipo de templado que se desea procesar, inclusive, se permite la reprogramación para adicionar alguna fase y/u otras necesidades, Fig. 6.

#### V. CONCLUSIONES

Se construyó un termociclador adaptado para dispositivos microfluídicos hecho de componentes electrónicos sumamente baratos. Por ejemplo, usamos una resistencia de 5 W como calentador y un ventilador de una computadora para enfriarla. Para obtener los ciclos de temperatura implementamos un controlador PID en LabVIEW. Las ventajas de nuestro sistema es su bajo costo y portabilidad ubicándose en al menos un orden de magnitud por debajo de termocicladores comerciales. Nuestro sistema también es robusto y fácil de operar, a través de una interfaz de LabVIEW se pueden ajustar la cantidad de ciclos y su duración. Con la intención de evolucionar este diseño se trabaja para conservar los ideales iniciales pero a la vez, mejorar el rendimiento y eficacia de la técnica.

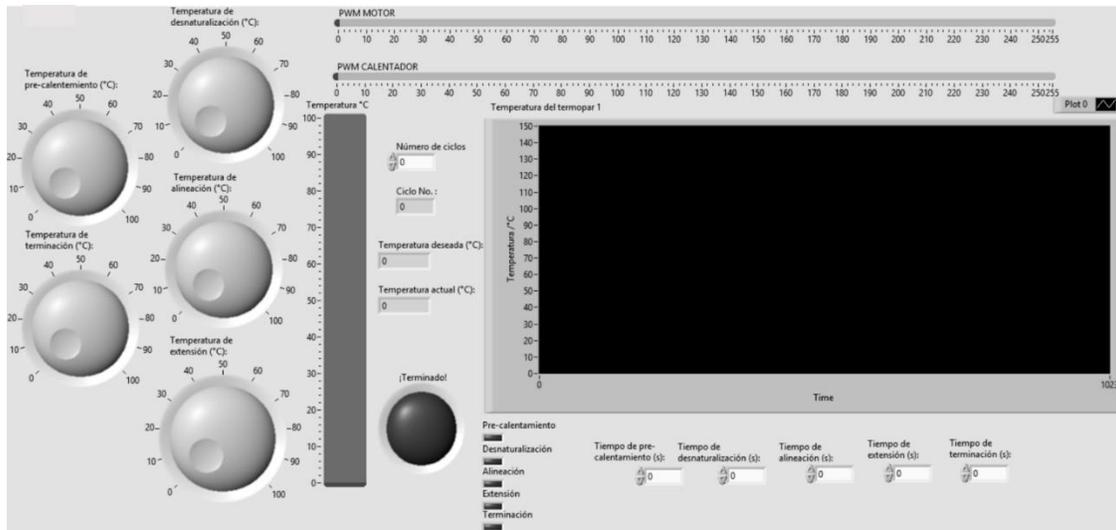


Figura 6. Imagen de la interfaz para el usuario creado con LabVIEW™ donde se muestran los controles para tiempo y temperatura e indicadores del nivel de PWM aplicado y temperatura en tiempo real.

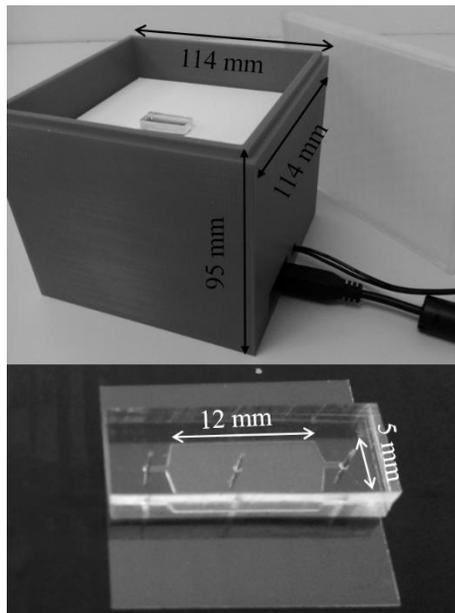


Figura 7. El cuadro a) especifica las dimensiones del contenedor del microdispositivo y b) muestra las del chip de microfluídica.

#### RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo de Diana F. Cedillo y Rocío Jiménez. También agradecen el generoso del CINVESTAV y del CONACYT, Fondos No. 226061.

#### BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. E. Asuar, “Guía práctica sobre la técnica de PCR”, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, 2004, ch. 17, pp.517–533
- [2] I. P. Rodríguez S., H. A. Barrera S., “La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos años de su invención”, *Ciencia UANL.*, vol. 7, no. 3, pp. 323-335, Sept. 2004.

#### BIBLIOGRAFÍA

- [3] J. Wu, W. Cao, W. Wen, D. C. Chang, and P. Sheng (2005, January). Polydimethylsiloxane microfluidic chip with integrated microheater and thermal sensor, *Biomicrofluidics* [en línea], vol. 3, pp. 8, Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1063/1.3058587>.
- [4] L. Liu, S. Peng, X. Niu, and W. Wen (2006). Microheaters fabricated from a conducting composite. *Applied Physics Letters* [en línea], vol. 89, pp. 4, Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1063/1.2400065>
- [5] et al., “High sensitivity PCR assay in plastic micro reactors”, *Lab on a chip*, vol. 2 pp. 179-187, 2002.
- [6] et al., “Inhibitory effect of common microfluidic materials on PCR outcome”. *Elsevier*. B161, pp. 349-358. 2012.