以 FPGA 为核心的流式细胞仪控制系统设计

吴云良 裴智果 陈忠祥 严心涛 武晓东
(中国科学院苏州生物医学工程技术研究所 苏州 215163)

摘 要：设计了一种以 FPGA 为核心的流式细胞仪控制系统。利用 FPGA 高速度、多接口和丰富的逻辑资源等优势，原本庞大复杂，可能拥有几十个电路板，上百甚至上千个芯片的流式细胞仪控制系统，被一个只有十几个芯片的简单电路板取代。这些改进增加了整个系统的可靠性，使其工作速度可以提升到百兆赫兹。很多在原有流式细胞仪控制系统中很难解决的问题，比如多通道数据同步、寻峰、积分等，在 FPGA 算法中被简单实现。这套系统实现了 8 路 A/D 数据同步采集，16 路 D/A 输出，若干数字 I/O 输出，在实验中稳定实现了流式细胞仪的各种控制操作，并采集了校准小球测试数据，8 峰可以明显区分。

关键词：FPGA；流式细胞仪；控制系统
中图分类号：TP274 **文献标识码**：A **国家标准学科分类代码**：510.99

Design of flow cytometry control system based on FPGA

Wu Yunliang Pei Zhiguo Chen Zhongxiang Yan Xintao Wu Xiaodong
(Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, CAS, Suzhou 215163, China)

Abstract: A flow cytometer control system using FPGA is designed. The traditional flow cytometry control system is very large and complex, with dozens circuit boards, hundreds or even thousands of chips. With the advantages of FPGA's high speed, multi-SelectIO interface and abundant logic resources, the control system can be optimized to a simple circuit board, with no more than a dozen chips. The improvements increase the reliability of the whole system, up the system process speed to megahertz. In FPGA algorithm, many difficulty problems are solved easily, such as multi-channel data synchronization, peak search, area integration, etc. The control system can achieve up to 8 channels A/D data synchronous acquisition, 16 channel D/A output, several digital I/O output. In the experiment, a variety of control operations are steady achieved, and the 8-peak rainbow calibration particles is measured and displayed.

Keywords: FPGA; flow cytometry; control system

1 引 言

流式细胞术是利用流式细胞仪对处于快速直线流动中的单细胞的特性及其成分或其他各种微小颗粒及其负载物进行多参数分析和分选的技术，其特点是检测速度快、测量参数多、采集信息量大、分析全面、方法灵活[1]。流式细胞仪是可以帮助临床医生快速实现常规免疫表型[2-3]，CD4T 细胞计数[4-5]、DNA[6-7]、网织红细胞[8]、血小板[9-10]等临床分析，是遗传、肿瘤、血液、免疫功能等诸多研究不可或缺的重要工具。流式细胞仪是集激光技术、电子物理技术、光电测量技术、电子计算机技术、细胞荧光化学技术等技术为一体的一种新型高科技仪器，其控制系统需要对激光功率，流体速度，探测器增益，信号采集等等各方面进行监测和控制，这就导致了早期流式细胞仪产品的高昂价格以及庞大体积。

随着集成电路的发展，尤其是高性能的 FPGA(field programmable gate array)和 DSP(digital signal processor)的出现，控制系统得到了一个很大的提升机会，可以实现更高的集成度，更快的运行速度[11-14]。该文就是以 FPGA 为核心来实现整个流式细胞仪控制系统的设计，以小体积、低成本、高速度、高稳定性和高灵活性优势，来取代传统流式细胞仪控制系统。

2 控制系统硬件设计

2.1 流式细胞仪系统概述

流式细胞仪框架[1](见图 1)可以分为以下几个部分、机械部分，固定和加持各种模块；流体部分，包括鞘液流和样品流，通过流体聚焦实现细胞(微球)排成一排，单个经过

收稿日期：2014-09

检测区;光源部分,不同波长激光,可以实现不同染料的荧光激发;光探测部分,实现前向、侧向和各种荧光信号的探测;控制部分,对各个模块进行控制和数据采集并处理;软件部分,对控制系统处理过的数据进行显示、统计、设门等。流式细胞仪能实现每秒上万个样品检测,前向、侧向和 4-6 通道荧光信号的同步采集处理。

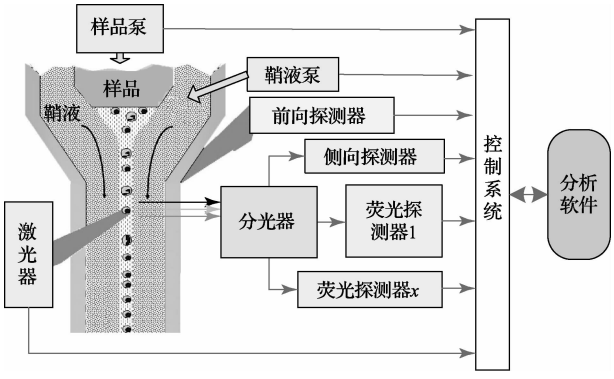

图 1 流式细胞仪结构

2.2 控制系统硬件设计

控制系统主要由以下几部分组成(见图 2):FPGA,控制和算法处理核心;USB、FPGA 与软件通信;A/D,采集信号;时钟,同步多通道 A/D 始终信号;D/A、控制探测器偏压、泵等;数字 I/O,对仪器状态进行监测和控制。

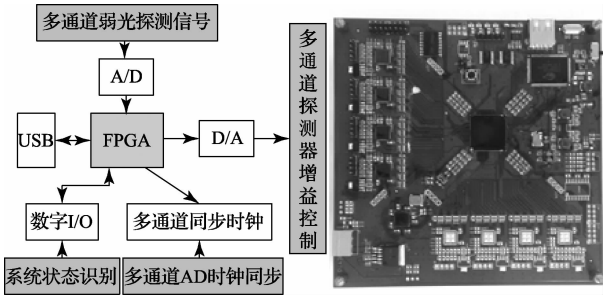

图 2 控制系统框图和实物

FPGA 采用 Xilinx 公司的 xc3s1600e,拥有 250 个用户可用的 I/O,能够保证流式细胞仪多通道 A/D 采集和 D/A 输出,以及众多传感器的控制的需求,同时大量的 RAM,也能保证实时存储大量的数据。

USB 采用了 Cypress 公司的 cy7c68013a,工作在 USB2.0 协议下,最高可支持 480 Mbps 的传输速率。操作者通过分析软件进行操作,通过 USB 将命令发送给 FPGA,经过 FPGA 处理后实现指定动作,并采集信号数据,处理,然后再通过 USB 上传给分析软件。

A/D 采用了 AD 公司的 16 位单通道芯片,该芯片采用差分输入模式,采集速率可达 40 MHz。系统支持 8 个通道 A/D 的同时采集。通过多通道同步时钟实现多通道的同步触发采集。

D/A 采用了 TI 公司的 12 位 8 通道 D/A 芯片。2.5~5V 的电压输出,可以满足光探测器偏压设置,以及流体泵的控制。

数字 IO 针对一些仪器状态进行监控,比如液位传感器,对鞘液和样品液位进行监测,防止液体用完。

3 FPGA 程序设计

按照控制系统从上位机分析软件接收命令,解析命令,执行命令,返回数据的思路进行软件设计(见图 3)。顶层模块主要负责对命令进行解析,并调用子模块实现功能,同时完成数据处理,存储和传输。子模块包含 USB 通信模块,细胞数据模块,示波器模块,D/A 模块和数字 I/O 模块。

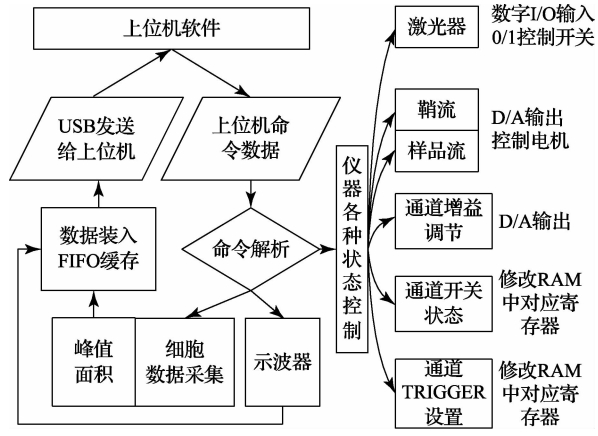

图 3 FPGA 程序功能

3.1 USB 模块

USB 模块采用 Slave FIFO[15] 模式,由 FPGA 对数据传输进行控制。在固件设计中定义了端 2 为 PC 端软件给 FPGA 发送数据的缓冲区,FlagA 指示其是否为空,对应的 FIFOAdr = 00;端点 6 为 FPGA 向 PC 端软件发送数据的缓冲区,FlagC 指示其是否为满,对应的 FIFOAdr = 01。

为了保证程序运行的稳定,排除竞争冒险和外界干扰等因素,采用有限状态机来实现 FPGA 对 USB 的读写控制(见图 4)。

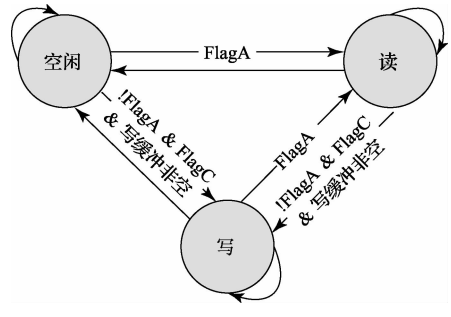

图 4 USB 状态机

闲状态：在此状态，FPGA 优先检测 FlagA，然后检测 FlagC 和 W_FIFO 是否为空。这是状态机的默认状态。

读状态：如果 FlagA 为真，则无论当前处在什么状态，都将跳到读状态。

写状态：当 FPGA 从 USB 读取命令完成，经过命令解析，就开始进行数据采集和处理，然后往存 W_FIFO 中写数据。当 FlagA ＝ 0，即不在读状态时，通过检测 FlagC 来判断端点 6 的 FIFO 是否满，同时通过检测 W_FIFO 的空标志管脚，来判断有没有细胞数据，若都满足，则跳到写状态。

3.2　细胞数据模块

在系统中，同时有 8 个 A/D 芯片在采集数据，所以有 8 个相同的 A/D 模块。每个模块通过顶层模块设定的触发值，与 A/D 采集的数据进行比较，判断是否为细胞信号。当细胞信号开始时，启动寻峰计算和面积积分。当细胞信号结束时，停止寻峰计算和面积积分，并将数据存入通道对应的 FIFO 中（见图 5）。

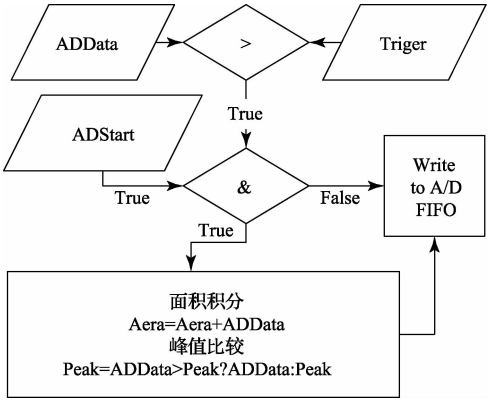

图 5　细胞数据处理流程

由于同一时刻，8 个通道 A/D 采集的数据表征的是一个细胞的信息，但由于电路布局布线，导致 8 个通道存在一定延时，所以要将 8 个通道数据同步匹配成以一个细胞为单位的数据组，以保证数据的正确性[16]。先确定这样一个前提：每个 A/D 通道对一个细胞，都会产生一个采集数据。首先为每个通道设置一个 FIFO，通过判断每个 FIFO 是否都为非空，来判断各个通道的数据计算和存储是否完成；然后给 8 个 FIFO 一个读信号，每个 FIFO 读出一个数据后，并行拼接成一个数据，写入下一级并转串的 FIFO。通过精确设计这两级 FIFO 的读写延时，可以克服 8 个 A/D 通道之间的延时，从而保证数据不出现错位。

3.3　示波器模块

这个模块主要用于仪器的调试和校准。和细胞数据模块类似，当 A/D 数据大于触发值时，启动过程。准实时采集 1 024 个数据点，并发送给上位机分析软件显示信号波形（见图 6）。

通过对样品经过检测区时，信号波形的观察，可以确认激光强度，流速等是否合理，整个仪器是否存在故障。

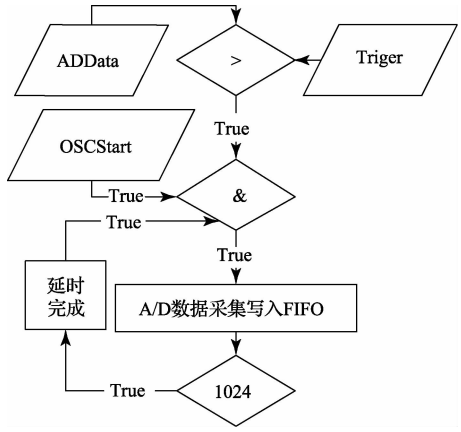

图 6　示波器流程

3.4　D/A 模块和数字 I/O 模块

顶层模块通过修改对应缓冲区数据，并触发使能，就能调用这 2 个模块进行相关操作，比如修改探测器偏压，接收传感器信号等。

4　实验结果

为了验证系统各部分的功能，编写了基于 MFC 的测试程序（见图 7）。A 部分主要用于进行 D/A 和数字 I/O 测试，以及触发值的设置；B 部分用于测试示波器功能；C 部分用于测试细胞数据模块。

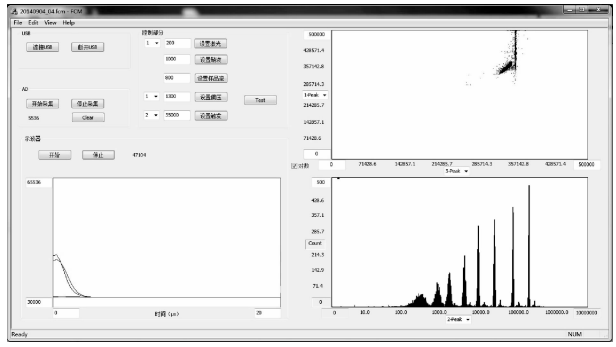

图 7　测试软件界面

为了验证 FPGA 程序设计的正确性，将控制系统与流式细胞仪硬件连接，并使用 Spherotech 公司的彩虹 8 峰校准微球。首先，通过 A 部分控制激光，设置流速，设置多个光信号探测器的偏压，和触发值；其次，开启示波器功能，采集到各个探测器信号，通过调整 A 部分的相关参数，可以得到一个合适的波形：微球信号宽度在 4 μs 左右，各通道信号强度大且未出现饱和，这里一方面验证了 D/A 和数字 I/O 功能的正确性，又验证了示波器功能的正确性；最后进行 C 部分细胞数据采集，软件上显示了前向和侧向的散点图，和荧光波长 690 nm 的 8 峰信号对数直方图。图 8 是 690 通道和 585 通道的对数直方图。

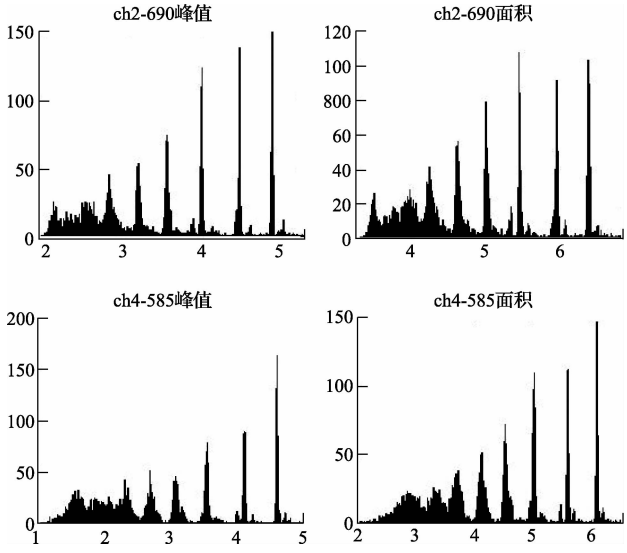

图 8 荧光信号直方图

5 结 论

以 FPGA 为核心开发了流式细胞仪的控制系统,实现了以一个体积小功能简单的电路板,替代了传统流式细胞仪中庞大而复杂的硬件控制系统,并且在处理数据速度和准确度方面都有了很大的提高;同时,结合 FPGA 芯片的可反复擦写优点,在不改变硬件的条件下,可以通过配置不同的 FPGA 代码,实现不同的功能和处理算法,不但可以使我们的流式细胞仪实现通用功能,更可以针对具体应用进行特殊定制。

参考文献

[1] 赵书涛,武晓东,王策,等. 流式细胞仪的原理、应用及最新进展[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(22): 4378-4381.

[2] LI X, DU W, LIU W, et al. Comprehensive flow cytometry phenotype in acute leukemia at diagnosis and at relapse[J]. Apmis, 2010, 118(5): 353-359.

[3] TRACY B P, GAIDA S M, PAPOUTSAKIS E T. Flow cytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2010, 21(1): 85-99.

[4] DIEYE T N, DIAW P A, DANEAU G, et al. Evaluation of a flow cytometry method for CD4 T cell enumeration based on volumetric primary CD4 gating using thermoresistant reagents [J]. Journal of Immunological Methods, 2011, 372(1-2): 7-13.

[5] WANG L L, ABBASI F, ORNATSKY O, et al. Human CD4 (+) lymphocytes for antigen quantification: Characterization using conventional flow cytometry and mass cytometry[J]. Cytometry Part A, 2012, 81A(7): 567-575.

[6] DARZYNKIEWICZ Z, HALICKA H D, ZHAO H. Analysis of Cellular DNA Content by Flow and Laser Scanning Cytometry [M]. POON R Y C. Polyploidization and Cancer. 2010: 137-147.

[7] HUANG P J J, LIU J W. Immobilization of DNA on magnetic microparticles for mercury enrichment and detection with flow cytometry [J]. Chemistry-a European Journal, 2011, 17(18): 5004-5010.

[8] BORRIONE P, SPACCAMIGLIO A, PARISI A, et al. A biparametric flow cytometry analysis for the study of reticulocyte patterns of maturation [J]. International Journal of Laboratory Hematology, 2010, 32(1): 65-73.

[9] LACROIX R, ROBERT S, PONCELET P, et al. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop[J]. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2010, 8(11): 2571-2574.

[10] VON B N, SIBBING D, JAWANSKY S, et al. Assessment of platelet response to clopidogrel with multiple electrode aggregometry, the VerifyNow P2Y12 analyzer and platelet vasodilator-stimulated phosphoprotein flow cytometry [J]. Blood Coagulation & Fibrinolysis, 2010, 21(1): 46-52.

[11] MONMASSON E, CIRSTEA M N. FPGA design methodology for industrial control systems-A review[J]. IEEE Trans Ind Electron, 2007, 54(4): 1824-1842.

[12] MONMASSON E, IDKHAJINE L, NAOUAR M W. FPGA-based Controllers[J]. IEEE Ind Electron Mag, 2011, 5(1): 14-26.

[13] 郭永彩,苏渝维,高潮. 基于 FPGA 的红外图像实时采集系统设计与研究[J]. 仪器仪表学报, 2011, 32(3): 514-519.

[14] 黄武煌,王厚军,叶芃. 一种高速全波形采集与高精度定位技术研究[J]. 仪器仪表学报, 2013, 34(1): 74-79.

[15] 何苏勤,黄翠翠. 基于 USB2.0 的异步数据传输和控制接口的设计[J]. 国外电子测量技术,2010,29(3): 101-106.

[16] 郭连平,田书林,蒋俊,等. 高速数据采集系统中触发点同步技术研究[J]. 电子测量与仪器学报, 2010, 24(3): 224-229.

作者简介

吴云良,工学博士,助理研究员。主要研究方向为光电仪器与测试技术。

E-mail:wuyl@sibet.ac.cn