

基于 FPGA 和 STM32 的流式细胞仪 数据采集系统设计

于丽华, 宋树祥, 李 顺

(广西师范大学 电子工程学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 针对流式细胞仪采集微弱信号高速高精度的需求, 设计了一种基于 FPGA 和 STM32 控制的模数转换多通道高速高精度数据采集系统; 该系统接收并调理放大光电转换后的微伏级细胞脉冲电信号, 经模数转换传给 FPGA 作识别, 再由 STM32 读取传至上位机分析处理; FPGA 结合 STM32 单片机控制其外围芯片, 可实现数据的同步采集、实时缓存和高速传输; 为验证系统的有效性, 采用彩虹八峰微球上机测试, 实验结果表明荧光通道荧光检出限以及荧光线性符合国家标准, 满足流式细胞仪数据采集的高速高精度要求, 在医疗电子仪器设计领域具有广阔的应用前景。

关键词: 流式细胞仪; 数据采集; FPGA; STM32; 八峰微球

Design of Flow Cytometry Data Acquisition System Based on FPGA and STM32

Yu Lihua, Song Shuxiang, Li Shun

(College of Electronic Engineering, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: In order to meet the demand of high-speed and high-precision acquisition of weak signal acquisition by flow cytometer, a multi-channel high-speed and high-precision data acquisition system based on FPGA and STM32 control is designed. The system receives and modulates the microvolt-level cell pulse electrical signal after amplification and photoelectric conversion, and transmits it to the FPGA for identification by analog-to-digital conversion, and then reads and transmits it to the upper computer for analysis and processing by STM32. FPGA combined with STM32 MCU is used to control its peripheral chips, it realizes synchronous data acquisition, real-time buffering and high-speed transmission. In order to verify the effectiveness of the system, it was tested by rainbow eight-peak microspheres. The experimental results showed that the detection limit of the fluorescence channel and fluorescence linearity were in line with national standards and met the high precision requirements of flow cytometry data acquisition, which means it has a broad application prospect in the field of medical electronic instrument design.

Keywords: flow cytometry; data acquisition; FPGA; STM32; eight peak microspheres

0 引言

流式细胞术已成为分子生物学、医学、免疫学、病理学、植物生物学、海洋生物学等众多领域中一种高速、高灵敏度分析荧光信号的研究方法^[1]。流式细胞仪拥有同步采集、多参数细胞分析的优点, 可以快速全面的检测大细胞群。其硬件与试剂的共同发展使其能够实现单个细胞的多参数分析, 这对流式细胞仪的数据采集能力提出高速、高精度、多通道的要求。传统的多通道数据采集系统大多数是靠模数转换(ADC)芯片的多通道分时复用实现, 此方法难以实现同步和高速高精度采集^[2]。此外, 还有使用数据采集卡的方法,

但其核心技术不公开, 无法针对具体需求修改和升级, 而且集成度不高, 价格昂贵, 后期维护不便。

本文设计了一种基于 FPGA 和 STM32 控制的模数转换多通道数据采集系统, 采用多片双通道 ADC 芯片并行采集。FPGA 给各 ADC 芯片提供驱动信号控制数据采集, 并对采集到的信号识别处理, 实时缓存。STM32 从 FPGA 上读取数据后, 经网口高速传输至上位机作下一步分析处理。这一方法既保证了整个数据采集系统的同步性, 又达到了高速高精度的要求, 还可以根据数据采集需求的变化及时修改软硬件设计, 满足系统需求。

1 系统结构及原理

流式细胞仪多通道数据采集系统主要由数据采集和数据传输两部分组成。数据采集部分主要由光电探测器、信号调理放大模块和模数转换器(ADC)组成, 由 FPGA 对采集部分进行控制, 并且实现数据识别处理, STM32 单片机对数据传输部分进行控制。系统的总体结构图如图 1 所示。

流式细胞仪的采集通道根据光信号性质的不同可以分为散射光通道(FSC、SSC)和荧光通道(FL1~FL7)共

收稿日期: 2019-07-22; 修回日期: 2019-09-03。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(61361011), 广西自然科学基金项目(2017GXNSFAA198363)。

作者简介: 于丽华(1995-), 女, 江苏南通人, 硕士, 主要从事电路设计与嵌入式应用方向的研究。

通讯作者: 宋树祥(1970-), 男, 湖南双峰人, 教授, 博士, 主要从事致力于集成电路、嵌入式系统研究与应用方向的研究。

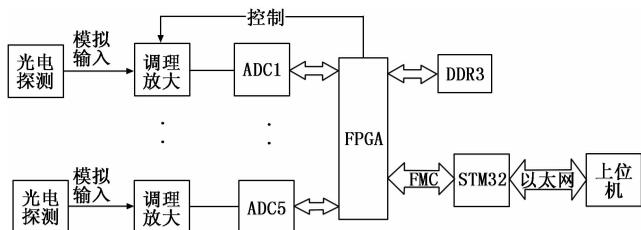


图 1 系统总体框图

计 9 路通道，因此本系统采用 5 片双通道 ADC 同步采集。光信号经过多路光电探测器后转变为微安级模拟电流信号，经过调理放大电路进行 I/V 转换、放大滤波，形成的模拟电压信号由 ADC 转换为数字信号传送给 FPGA。通过 FPGA 实现识别处理，将脉冲参数数据通过 FMC 总线传送给 STM32，最终由 STM32 通过网卡发送给上位机进行处理分析。系统采用 FPGA 给每个通道提供统一的采样时钟来保证通道间的同步性，并且对 ADC 芯片的工作模式进行上电配置。为了实现彩虹微球 8 峰的测量，荧光探测的动态范围应达到 10^4 。而流式细胞仪探测通道量不能低于 10 000 个细胞每秒，就必须要求每个通道的同步采样速率不应该低于 5 MSPS^[3]。并且仪器性能需要达到国家标准，即荧光检出限应小于 200 MESF (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome)，荧光强度线性相关系数 (r) 应大于 0.98。

2 系统硬件设计

信号采集是流式细胞仪控制的中心，也是后续数据传输和处理的基础^[4-6]。本系统采用多通道同步 ADC 高速高精度的方式实现信号采集，信号采集部分主要由 I/V 转换、程控放大、差分滤波、模数转换器 (ADC)、FPGA 组成。光信号通过光电转换后，经由 I/V 转换成模拟电压信号，经过程控放大、差分滤波后模数转换成数字信号作处理。由 FPGA 实现对 ADC 的驱动控制和对 DDR3 进行读写控制，并对细胞脉冲识别和细胞原始脉冲数据存储以及与 STM32 进行数据交互。数据采集流程框图如图 2 所示。

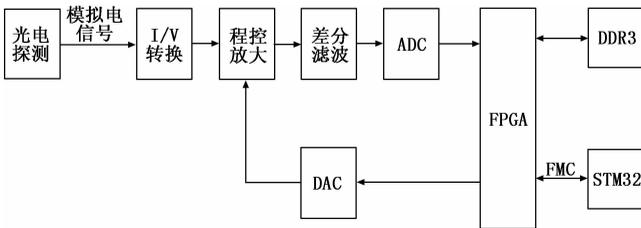


图 2 数据采集流程框图

2.1 信号调理电路设计

如图 3 所示调理放大电路，为了能够采集光电探测后的微弱电流信号，须对其进行 I/V 转换，即将电流转变为电压。电路中采用控制简单、动态范围大且线性度好的反向放大电路作为次级放大电路，且在进行 I/V 转换的同时还能对电压信号进行放大。R4 与 C3 组合成 RC 滤波电路，起到耦合隔离、滤波的作用。程控放大电路通过调节 DAC

内部的阻抗以改变电压的放大倍率，DAC 内部结构实质是电阻网络，当上位机对 DAC 进行配置时，即配置 DAC 内部不同的电阻组合。将 DAC 内部电阻与运放 U4 组合在一起构成反向放大电路以改变放大倍数，即实现上位机对底层模拟放大电路的增益可调的效果。

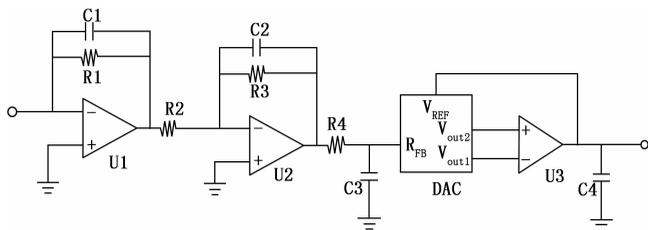


图 3 调理放大电路

在微弱电压信号经过程控放大后，对其进行差分滤波，可起到去除部分共模噪声的作用。C5 和 C6 起到了隔直流的作用，R5、R6、C7 给 ADC 提供驱动电压，R7 和 C8、R8 和 C9 组合成 RC 滤波电路，达到耦合隔离、滤波的效果，以提高信号采集的精确度。差分滤波电路如图 4 所示。

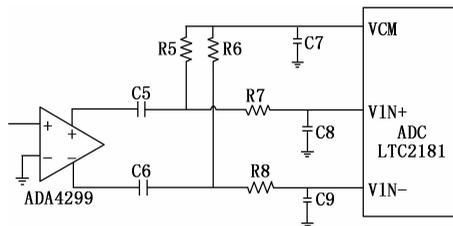


图 4 差分滤波电路

2.2 模数转换模块设计

从流式细胞仪数据采集系统的设计需求可知，ADC 芯片的采样速度以及精确度对系统来说至关重要。本系统采用的是 ADI 公司的 LTC2181 型号芯片。该芯片模数转换精度为 16 bit，支持双通道同步采样，最高采样频率为 40 MSPS，支持 SPI 编程控制最高 SNR 为 77 dB，因此可以满足设计需求^[7]。LTC2181 的数据采集转换时序如图 5 所示。

本系统采用 LTC2181 芯片双通道 COMS 输出，根据其接口时序可知，FPGA 的接口上只需要控制采样时钟信号 ENC，反馈时钟信号 CLKOUT 和输出数据信号 D1_0_1...D_1_14_15、D2_0_1...D2_14_15，超限信号 OF2_1。ADC 工作中，ENC+ 信号的上升沿触发 ADC 采集数据，并将 16 Bit 数据的偶数位由输出数据信号管脚输出；在 ENC+ 信号的下降沿触发，由输出数据信号管脚输出奇数位。同时输出的超限信号 OF2_1 在 ENC+ 在高电平时代表第二通道的数据是否有效（高电平无效），在 ENC+ 在低电平时代表第一通道的数据是否有效（低电平有效）。CLKOUT 信号可以在程序中用来锁存上述输出管脚的数据。由数据手册可知，ENC 信号的最高采样频率可以达到 40 MSPS，明显高于系统需求 5 MSPS。

为验证采集系统时序的正确性，利用嵌入式逻辑分析仪 (SignalTap II Logic Analyzer) 对 LTC2181 数据采集的结果进

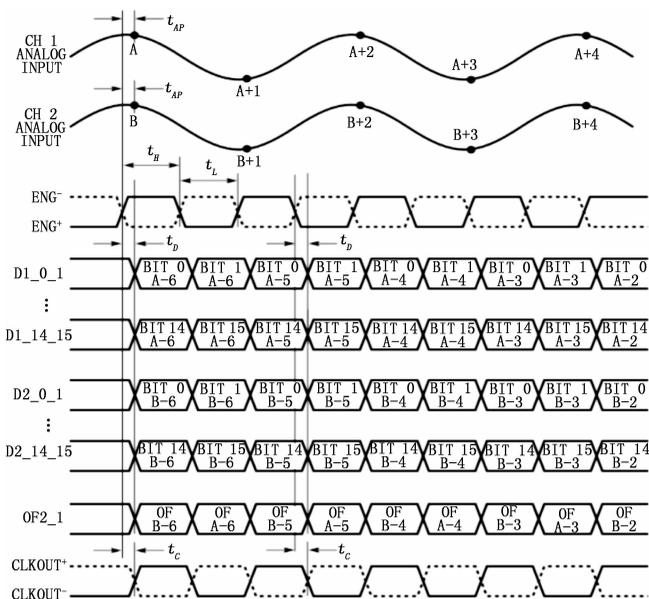


图 5 LTC2181 的数据采集转换时序图

进行测试, 验证电路的行为和设计意图, 如图 6 所示^[8]。

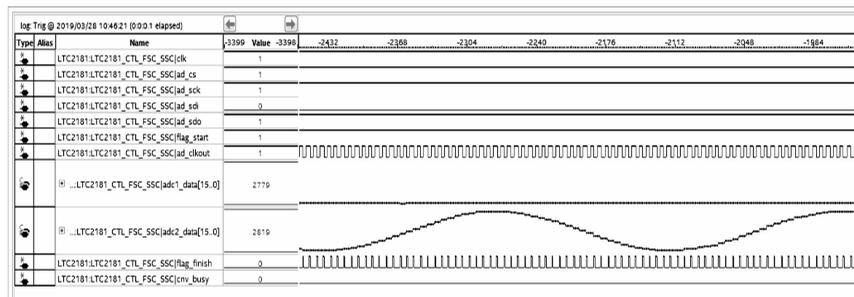


图 6 嵌入式逻辑分析仪验证结果

图 6 对 LTC2181 数据采集模块进行验证, 模拟电压信号经过放大滤波之后输出至 LTC2181 的输入端, 并把十六位数字信号和转换控制信号连接到 FPGA 的 GPIO 接口, 所采集的信号经过调理处理, 最终转换的幅值在 0.9 V 左右, 满足 LTC2181 的输入范围。经过测试采集到的数字信号以二进制补码编码, 并且以 16 进制显示。

2.3 FMC 接口电路设计

FPGA 采用的是 Intel 公司的 5CEFA4F23C8 型号芯片, 该型号属于 CYCLONE V 系列, 具有 49 K 逻辑门, 484 管脚 BGA 封装, 224 个 IO 口, 满足系统控制的需求。此外, 系统选用的是 ST 公司的 STM32F429 型号单片机作为数据传输控制芯片。FMC 是 STM32F4 系列采用的一种新型的存储器扩展技术, 拥有 6 个存储区域, 每个区域支持 256 MB 的寻址空间^[9]。因此, 可以将 FPGA 用作 STM32F429 的外部 SRAM 来配置, 通过扩展出的数据总线、地址总线、控制总线来实现操作, 这样既能保证有较快的操作速度, 又具有很高的灵活性。FPGA 与 STM32 接口硬件连接如图 7 所示。

将 FPGA 直接挂载到 STM32 的 FMC 总线上, FMC 提

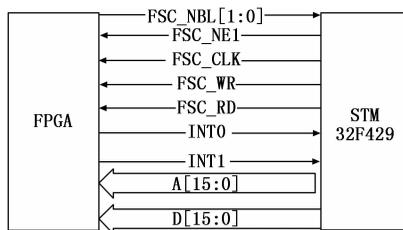


图 7 FPGA 与 STM32 接口硬件连接图

供了 4 个 Bank 用于连接不同的外部存储器。FMC_NE1 是 Bank1 第一区的片选信号, FMC_RD 和 FMC_WR 分别为接口的读写信号。根据所设计的要求, 数据位宽为 32 位, 地址位宽为 16 位, 将数据线 [31: 0], 地址线 [15: 0] 连接到 FPGA 的 I/O 端口, 这样 FPGA 就作为 STM32 的外设接入, 可以通过存储器读写指令访问 FPGA。FPGA 采集到细胞信号, 将 INT0 拉高产生中断信号通知 STM32, STM32 开始读取 9 路数据信号, 读到一个细胞的 9 路数据之后, STM32 通过网口发送给上位机。当 FPGA 拉低 INT0 时, STM32 停止读取数据, 一旦 FPGA 将 INT1 拉高, 通知 STM32 计数完成。

FMC 接口能够及时将数据传输给 STM32, STM32 将数据通过网口上传至上位机分析处理。同时 STM32 通过 FMC 接口转发上位机指令给底层模块, 实行对数据采集卡的各种寄存器和电路的某些状态进行访问, 从而控制数据采集系统的底层模块。

3 系统软件设计

3.1 信号采集

细胞脉冲信号的采集系统采用了 FPGA 和 STM32 组合的方式, 两种核心器件发挥各自的优点, 避免单一芯片在采集与处理数据上的局限性^[10]。FPGA 拥有灵活的逻辑可操作性, STM32 拥有丰富的外设功能和数据传输能力, 能够高效快捷的完成信号的采集传输, 信号采集软件流程如图 8 所示。

3.2 脉冲信号识别

数据采集到的模拟电压信号经过模数转换, 传至 FPGA 进行脉冲数据识别。FPGA 在内部时钟的驱动下按照一定时序读取与 LTC2181 连接 IO 口的电平, 通过对一段时间连续输入值的变化趋势判断出上升沿和下降沿。取上升沿与下降沿区间内的最大值作为细胞脉冲信号的峰值, 从出现上升沿到下降沿结束的时间与采集到的所有数据, 分别作为脉冲信号的宽度和面积。FPGA 把识别到的参数缓存在 FIFO, 然后定量批次输出。

3.3 数据传输通信

在整个计数和数据传输过程中, 上位机发送开始计数命令, 下位机 STM32 收到命令后, 返回 ACK 信号给上位机。上位机接收到 ACK 信号后, STM32 发送命令至 FPGA 启动 ADC 开始计数并且控制液路控制板开始形成鞘流。FPGA 实现数据的采集, STM32 读取采集到的数据信号并

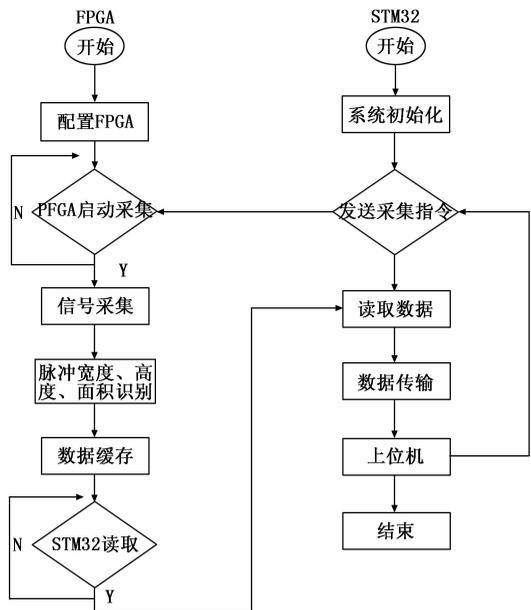


图 8 信号采集软件流程

不断发送数据包给上位机。一旦上位机发送结束指令，STM32 停止发送数据，并且发送指令给 FPGA 停止计数，上位机对接受到的数据进行分析处理。STM32 与上位机之间的数据传输流程如图 9 所示。

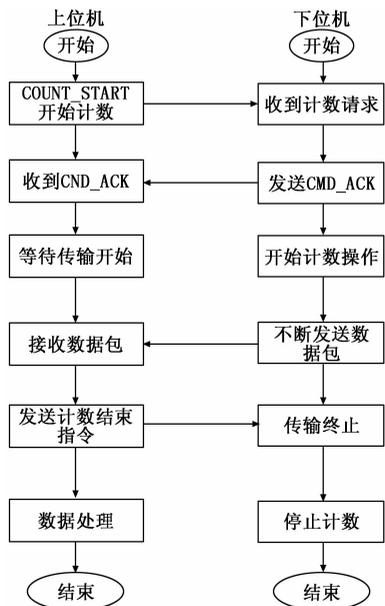


图 9 数据传输流程

4 实验结果与分析

4.1 八峰测量验证

为了验证设计应用于流式细胞仪的数据采集系统的有效性，实验中利用 Spherotech 公司的 8 峰彩虹微球来对系统进行性能评估。8 峰彩虹微球 (RCP-30-5A) 是尺寸一致但携带八种不同数量级荧光探针的粒子，经过激光照射后会激发出八种不同的荧光强度。采用八峰试剂测量后，

FL1 荧光通道的对数直方图如图 10 所示。

图 10 中横坐标表示荧光强度，纵坐标表示粒子数，荧光探测的动态范围能达到 10^6 。由图 10 可知，仪器能较好的分出八种携带不同数量级荧光探针的微球。1~8 峰之间能明显区分且噪声毛刺较少。因此，本文所设计的数据采集系统满足采样高精度的要求，同时具有足够大的动态范围且高于系统需求 10^4 ，能够分辨更大数量级范围内荧光强度。

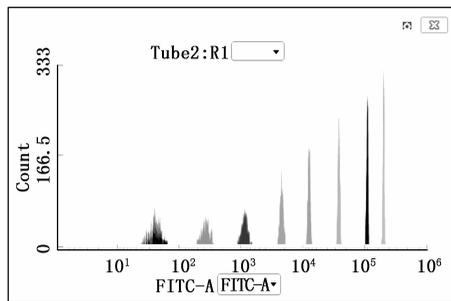


图 10 8 峰彩虹微球测试图

4.2 荧光检出限及荧光线性验证

为了进一步定量验证仪器性能，根据实验数据计算出荧光检出限以及荧光线性，以此判断数据采集的精确度。采用彩虹八峰微球试剂上机测试，得到图 10 中 1~8 峰的平均荧光强度 CH，微球说明书中提供 2~8 峰的等量可溶性荧光分子 (MESF) 数的参考值^[11]。将 2~8 峰的平均荧光强度和等量可溶性荧光分子数分别取对数作线性回归，空白微球处 (1 峰) 的 MESF 就是荧光检出限。根据线性回归计算出相关系数 (r)，可以得出荧光线性。测试数据如表 1 所示。

表 1 荧光检出限及荧光线性数据表

PEAK	CH	MESF	LogCH	LogMESF
1(空白微球)	36	101.874 824 3	1.556 302 501	2.008 066 873
2	258	771	2.411 619 706	2.887 054 378
3	1 140	210 6	3.056 904 851	3.323 458 367
4	4 477.5	626 2	3.651 035 595	3.796 713 063
5	12 521	151 83	4.097 639 016	4.181 357 592
6	37 700	452 92	4.576 341 35	4.656 021 499
7	108 368	136 258	5.034 901 058	5.134 362 01
8	199 510	291 042	5.299 964 669	5.463 955 666

根据表 1 中 2~8 峰的 LogCH 值与 LogMESF 值得到线性回归图 11。如图 11 所示，可以计算得到线性回归方程式，如下：

$$y = 0.8928x + 0.6186 \quad (1)$$

式中， x 为平均荧光强度的对数 LogCH、 y 为等量可溶性荧光分子数的对数 LogMESF。

由 (1) 式可得到空白微球处 (1 峰) 的 LogMESF 等于 1.855 450 188，则仪器荧光检出限约为 101.874 824 3 MESF。通过计算得到相关系数的平方 (r^2) 为 0.991 5，则荧光线性 (r) 约为 0.995 740 93。

根据流式细胞仪国标可知，荧光检出限应小于 200

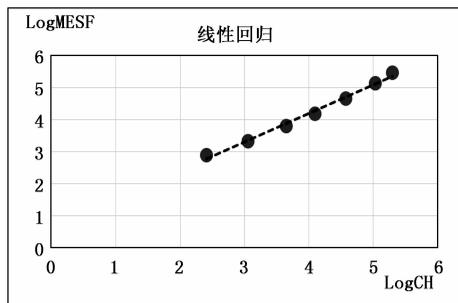


图 11 线性回归图

MESF, 荧光强度线性相关系数 (r) 大于 0.98。因此, 实验证明采集的数据能达到国家标准要求, 且系统测试效果较好, 本文所设计的数据采集系统具有良好的线性度、灵敏度, 能够满足流式细胞仪微弱信号的采集标准。

5 结束语

流式细胞仪的快速全面检测样本需求导致其对数据采集能力提出高速、高精度、多通道同步的要求。本文设计了一种基于 FPGA 和 STM32 控制的模数转换多通道高速高精度数据采集系统, 采用多片双通道 ADC 芯片并行采集, 采集速率最高可达到 40 MSPS, 实现了对光电转换后的细胞脉冲电信号的采集和传输。采用彩虹八峰微球上机测试, 实验数据表明, 仪器能较好的分出八种携带不同数量级荧光探针的微球且具有足够大的动态范围, 荧光检出限为 101.874 824 3 MESF, 荧光线性为 0.995 740 93, 均能达到国家标准要求且测试效果较好。经实际应用该系统能满足流式细胞仪数据采集高速高精度的要求, 在医疗电子仪器设计领域具有广阔的应用前景。

(上接第 266 页)

参考文献:

[1] 崔书彬. 软件测试的方法 [J]. 电子技术与软件工程, 2018 (16): 41.

[2] Boehm B, Brown J, Kaspar J, et al. Characteristics of Software Quality [Z]. North Holland, 1978.

[3] 王燕, 于美菊, 贾如. 基于改进 AHP 的教学质量评估方法 [J]. 计算机教育, 2018 (2): 156-160.

[4] ISO/IEC 25010: 2011; System and Software engineering—System and software Quality Requirements and Evaluation (SQuaRE)—System and software quality models, MOD [S]. International Organization for Standardization (ISO) /International Electrotechnical Commission (IEC), Geneva, Switzerland, 2011.

[5] ISO/IEC 25051: 2014; Software engineering—System and software Quality Requirements and Evaluation (SQuaRE)—Requirements for quality of Ready to Use Software Product (RUSP) and instructions for testing, MOD [S]. International Organization for Standardization (ISO) /International Electrotechnical Commission (IEC), Geneva, Switzerland, 2014.

[6] 刘凯, 梁欣, 张俊萍. 软件测试过程模型研究 [J]. 计算机科学, 2018 (A2): 518-521.

[7] 王昭翰. 基于 CMMI4 的软件测试过程模型研究 [J]. 信息化研究, 2019 (1): 44-46.

参考文献:

[1] Futamura K, Sekino M, Hata A, et al. Novel full - spectral flow cytometry with multiple spectrally - adjacent fluorescent proteins and fluorochromes and visualization of in vivo cellular movement [J]. Cytometry, 2015, 87 (9): 830-842.

[2] 裴智果, 王策, 陈忠祥, 等. 用于流式细胞仪的数据采集系统设计与实现 [J]. 电子测量技术, 2015, 38 (7): 84-88.

[3] Austin S, Piyasena M, Woods T, et al. One-dimensional acoustic standing waves in rectangular channels for flow cytometry [J]. Methods (Amsterdam), 2012, 57 (3): 259-271.

[4] 牛文举, 黄荣玉, 韩建强. 基于 FPGA 的微传感器信号采集系统 [J]. 传感器与微系统, 2019, 38 (5): 104-106.

[5] 徐文宽, 王保成, 周江华, 等. 基于 DSP 的传感器数据采集嵌入式系统设计 [J]. 信息技术与网络安全, 2019, 38 (2): 66-70.

[6] 刘秉刚, 常建华, 徐帆, 等. 基于 FPGA 的激光雷达数据采集系统设计 [J]. 电光与控制, 2018, 25 (12): 68-72.

[7] 罗旗舞, 黎福海. 基于 FPGA 双通道高速数据采集系统的设计与实现 [J]. 计算机测量与控制, 2010, 18 (11): 2656-2658.

[8] 杨磊, 刘美枝, 高海, 等. 基于 FPGA 和 ARM 的高速数据采集系统的设计 [J]. 山西大同大学学报 (自然科学版), 2017, 33 (6): 32-36.

[9] 范君健, 吴国东, 王志军, 等. 基于 FPGA+STM32 的多通道数据采集系统的设计 [J]. 兵器装备工程学报, 2017, 38 (12): 281-286.

[10] 王斐, 赵牛杰, 郝志超, 等. 基于 STM32 与 FPGA 的信号采集电路设计 [J]. 江苏大学学报 (自然科学版), 2018, 39 (2): 204-210.

[11] 王小林, 李昂, 杨硕. 流式细胞仪性能评价方法的建立 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36 (10): 1366-1367.

[8] Bill Hetzel. The Complete Guide to Software Testing [M]. 2nd ed. New York: A Wiley-QED Publication, 1988.

[9] ANSI/IEEE610.12-2002; Glossary of Software Engineering Terminology [S]. American National Standards Institute (US-ANSI), New York, USA, 2003.

[10] GB/T 25000.10-2016; 系统与软件工程 系统与软件质量要求和评价 (SQuaRE) 第 10 部分: 系统与软件质量模型 [S]. 中国国家标准化管理委员会, 北京, 中华人民共和国, 2016.

[11] 刘男, 关宇涵. 基于眼动实验与层次分析法 (AHP) 的设计方法研究 [J]. 湘潭大学自然科学学报, 2018 (6): 93-97.

[12] 王金星, 汪海涛, 姜瑛, 等. 基于三角模糊多层次分析法的软件质量评价模型研究 [J]. 计算机与数字工程, 2017 (9): 1693-1697.

[13] 曹毅, 赵波, 张利锋. 基于 AHP 的软件质量模糊综合评价研究与实现 [J]. 计算机测量与控制, 2013 (12): 3306-3308.

[14] 王昭翰. 基于 CMMI4 的软件测试过程模型研究 [J]. 信息化研究, 2019 (1): 44-46.

[15] 顾亚明. 基于 AHP 和模糊评价法的 P 公司供应商选择和绩效评价改进研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2018.

[16] 李海凌, 徐艳. 基于 AHP-模糊综合评价的工程项目投标决策 [J]. 招标与投标, 2018 (6): 36-38.

[17] 杜金环, 彭震. 软件质量模糊综合评价模型与实例分析 [J]. 信息技术, 2014 (7): 62-65.