

固相时间分辨荧光免疫分析仪数据采集系统的设计

张未来^{1,3}, 宋克非¹, 王云磊^{1,3}, 潘利华², 马庆军¹, 汪龙祺¹, 刘海波¹

1. 中国科学院 长春光学精密机械与物理研究所 应用光学重点实验室, 吉林 长春 130033;
2. 中国科学院 长春应用化学研究所 国家电化学光谱分析研究中心, 吉林 长春 130022;
3. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要:设计了一种基于复杂可编程逻辑器件(CPLD)的固相时间分辨荧光免疫分析仪的高速数据采集系统。采用将荧光寿命(从几百纳秒到十几个毫秒)分成13个区间,在不同的区间选用不同的采样频率的方法解决了采用统一采样频率不能满足精度要求的问题。使用VHDL硬件描述语言设计了CPLD内部逻辑电路,实现了采样时间、延迟时间、采样频率在线设置,具有操作方便,实时性能好等优点。实验结果表明:该系统具有荧光寿命测量和时间分辨荧光光谱测量两个功能,采样个数可在1~8192内任意设置,延迟时间可在1~65535 μs 内调节,分辨率为1 μs ,能够很好地适应大范围荧光寿命的精细检测。

关键词:荧光寿命;时间分辨荧光光谱;复杂可编程逻辑器件;数据采集

中图分类号:TH744.1; TP274 **文献标识码:**A

Design of data acquisition system of solid-phase time-resolved fluorescence immunoassay instrument

ZHANG Wei-lai^{1,3}, SONG Ke-fei¹, WANG Yun-lei^{1,3}, PAN Li-hua²,
MA Qing-jun¹, WANG Long-qi¹, LIU Hai-bo¹

1. *State Key Laboratory of Applied Optics, Changchun institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China;*
2. *National Analytical Research Center of Electrochemistry and Spectroscopy, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China;*
3. *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)*

Abstract: This paper describes the data acquisition system based on a Complicated Programmable Logic Device(CPLD) for a solid-phase Time-resolved Fluorescence Immunoassay Instrument(TRFIA) with the fluorescence lifetime from a few hundred nanoseconds to more than a dozen milliseconds. The fluorescent time is divided 13 sampling intervals and each interval can be sampled by different sampling frequencies, so that the measuring accuracy of the proposed system is improved. The VHDL language is used to design the CPLD-based internal logic circuit to set the number of samples, sampling time and delay time online. Measurement

results indicate that the system has measuring functions of both the fluorescent life and the time-resolved fluorescent spectra, and can set arbitrary number of samples from 1 ~ 8 192 and can adjust delay time from 1 ~ 65 535 μs in a resolution time of 1 μs , and one can found that it is suitable for the measurement of wide range fluorescence lifetime.

Key words: fluorescence lifetime; Time Resolved Fluorescence Spectra (TRFS); Complicated Programmable Logic Device (CPLD); data acquisition

1 引言

商品化液相时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 以极高的检测灵敏度在科研和临床中得到了广泛应用。但由于该体系需加入增强液将稀土离子解离以后再进行检测,是一种间接检测方法,且测量只能在液相中进行,而离子解离后不能产生特异的空间信号,故不适于荧光成像、免疫组化、DNA 芯片及在线检测等,这使得其应用范围受到限制。固像 TRFIA^[1]是一种直接检测体系,扩展了 TRFIA 体系的应用范围,可满足不同领域的分析需求^[2,3],因而受到国际生物医学界的重视。固像 TRFIA 体系的研究成果不仅对基因、蛋白组学研究和肿瘤、遗传基因变异以及重要病毒如艾滋病病毒等的原体诊断研究具有很高的实用价值,而且在消除放射性污染、保护环境方面具有重要意义。

目前实验室用于固相 TRFIA 的装置由 BOXCAR 平均器等仪器组成,该类仪器体积庞大,操作复杂,并且在完成时间分辨荧光光谱的测量过程中,测量结果需通过笔记录仪打印出来。这种方法不利于获得动态数据,且数据处理难度大,波长分辨率也受到限制。本文介绍的固相 TRFIA 仪克服了以上缺点,该仪器依据制备的稀土荧光标记物受激发产生荧光的基本参数进行光、机、电一体化设计。该仪器选用激发光波长为 337.1 nm 的氮分子激光器作为紫外激发光源;采用分光反射结构,对激发光路与收集光路进行光学设计;利用光的传播特性,选择材料形状和体积,设计新型免疫反应样品池;采用光电倍增管、光电二极管、复杂可编程逻辑器件 (CPLD) 等作为光电转换及数据采集器件。

另外,本文介绍了荧光检测技术的基本理论,

在仔细分析系统需求的基础上,设计了以单片机为主控制器,采用 Lattice 公司的高速 CPLD LC4256V 与之配合的数据采集系统^[4,5]。该系统能够完成荧光寿命测量和时间分辨荧光光谱测量两个功能;并且采用取样积分的方法减少随机误差,提高信噪比。

2 荧光检测技术

2.1 荧光寿命

时间分辨荧光主要研究荧光强度随时间的衰变过程,荧光寿命曲线如图 1 所示。以最简单的,即荧光发射是一个单光子过程为例,其荧光强度随时间衰变的过程可以用下式表示:

$$I_F(t) = I_F(0)e^{-t/T_0} (t \geq 0) \quad (1)$$

其中, $I_F(0)$ 是 $t=0$ 的初始时刻的荧光强度。图 1 是 $I_F(t)$ 时间衰变曲线, T_0 为荧光寿命^[6]。荧光寿命指激光器激发停止以后,荧光强度衰减到初始值的 $1/e$ 时所需的时间。在图 1 中,时间 $t=0$ 的点并没有选择在激光器发光的那个时刻,而是经过一段时间的延迟,这是为了避免脉冲激光和本底荧光带来的干扰。延迟时间从激光器发出激光

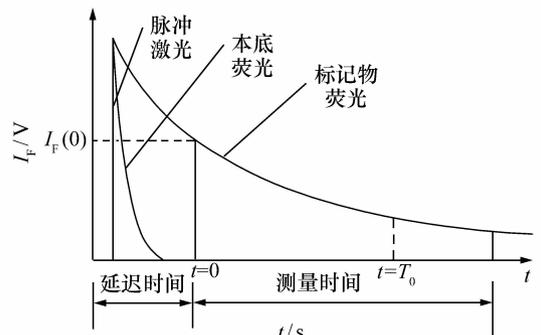


图 1 荧光寿命曲线

Fig. 1 Fluorescence lifetime curves

的时刻开始计时,若延迟时间产生漂移, $I_f(0)$ 的值就不准确,多次测量的荧光寿命会存在误差。为了减小延迟带来的误差,氮分子激光器采用外部触发,即使用 CPLD 产生触发脉冲,这样延迟时间就可以控制得很准确,大大提高测量的精度。

2.2 时间分辨荧光光谱

时间分辨荧光光谱是荧光物质在被激发后的不同时刻发射的光谱图,是以波长-时间-强度表征的三维光谱图。荧光寿命在不同的波长处相差不大,不同波长的荧光强度有明显的差别,对时间分辨荧光光谱的测量可以得到荧光发光物质的发光波长。本文测量荧光强度采用的方法是(如图2所示):从 $t = t_d$ 时刻起,在门宽为 Δt 的时间内对信号采样,然后将 n 次采样取平均值作为 t_d 时刻荧光的强度, Δt 的调节步长为 $1 \mu\text{s}$ 。

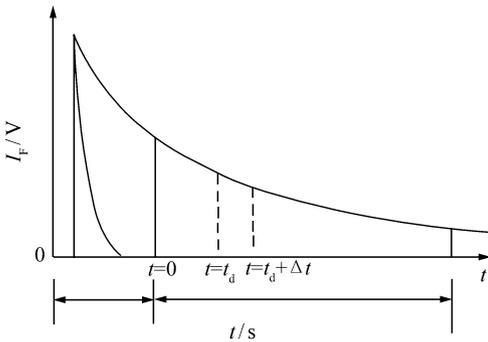


图2 荧光强度曲线

Fig. 2 Fluorescent intensity curves

2.3 采样频率的选择

对式(1)进行傅里叶变换得:

$$|I(\omega)| = I_f(0) / \sqrt{1/T_0^2 + \omega^2} \quad (2)$$

式(2)中 $\omega \in (-\infty, \infty)$ 。

由此可看出荧光频谱是一个连续谱,没有固定的截止频率 ω_c 。选择截止频率时,将 ω 在 $(-\omega_c, \omega_c)$ 集中的能量与整个信号能量的比值设为 ϕ ,其比例式为:

$$\frac{\int_{-\omega_c}^{\omega_c} 1/(1/T_0^2 + \omega^2) d\omega}{\int_{-\infty}^{\infty} 1/(1/T_0^2 + \omega^2) d\omega} = \phi \quad (3)$$

$$\frac{\arctan(T_0\omega) \Big|_{-\omega_c}^{+\omega_c}}{\arctan(T_0\omega) \Big|_{-\infty}^{+\infty}} \quad (4)$$

$$\omega_c = \frac{1}{T_0} \cdot \tan\left(\frac{\pi}{2}\phi\right) \quad (5)$$

其中, $\omega_c = 2\pi f_c$ (6)

综合前端放大电路、A/D 的分辨率,及信号的最大程度可恢复等一些因素选择一个合适的 ϕ ,定出 f_c 。根据采样定理,采样频率只要 $\geq 2f_c$ 就满足要求。在 ϕ 值一定的情况下,荧光寿命与采样频率成反比,由于荧光信号的寿命范围为几百纳秒到几个毫秒,若使用统一的采样频率,则会产生频谱泄露、或者是数据冗余,所以要将寿命细分为若干段,分别采用不同的采样频率,确保在合理的时间开销内,获得有效的数据。

3 硬件组成

由于要完成寿命和强度测量两个功能,选择了如图3所示的硬件组成。主控制器选择单片机 89C51,它主要完成对整个系统的控制,以及数据传输。双口 RAM 是 CPLD 和单片机的数据交换平台,首先单片机通过双口 RAM 把指令字及初始化数据写入 CPLD,然后 CPLD 又把采集到的数据存储到双口 RAM 中,等待单片机来读取。LC4256V 是一款高性能的 CPLD,最高工作频率可达 322 MHz,为了工作性能的稳定,可降频使用。其电源及接口电压为 3.3 V,内部有 256 个宏单元,具有丰富的硬件资源,能够很好地满足系统的需求。

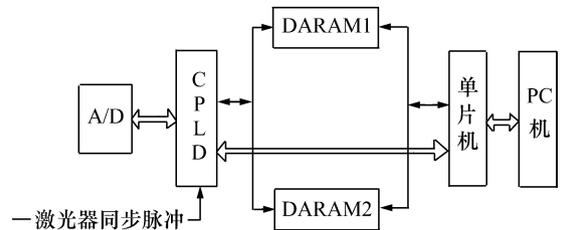


图3 硬件组成框图

Fig. 3 Hardware composition of the system

4 CPLD 系统设计

4.1 CPLD 工作流程

系统工作时,单片机首先通过串口从 PC 机

获取本次测量任务相关信息,分析处理后,把CPLD所需要的数据写到DARAM1中,然后启动CPLD工作。CPLD首先从DARAM1中读取指令字及初始化数据,等待激光器发出的同步脉冲,当同步脉冲到来后,经过一段时间延时,开始数据采集。其工作流程如图4所示:实验采用20 Hz的激光器,每秒发出20次激光,并且在发出激光的同时向外输出一个1 μs宽的同步脉冲。只要被测量物质不变化,每次激发出的荧光都相同。为了改善仪器性能,提高信噪比,在完成寿命测量的时候,采用10组数据平均的方法来获得高质量的数据。而在时间分辨荧光光谱的测量中,使用在 Δt 门宽时间内采用取样积分的方法,减少随机误差的干扰。

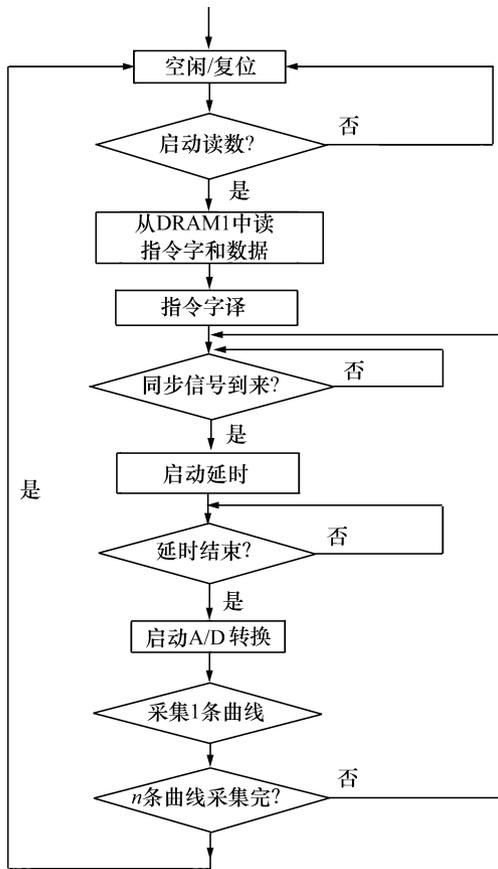


图4 CPLD工作流程图

Fig. 4 Work flow chart of CPLD

4.2 CPLD 内部逻辑结构

经过对需求的分析,CPLD的设计采用了如图5所示的内部结构。总线接口控制逻辑与双口

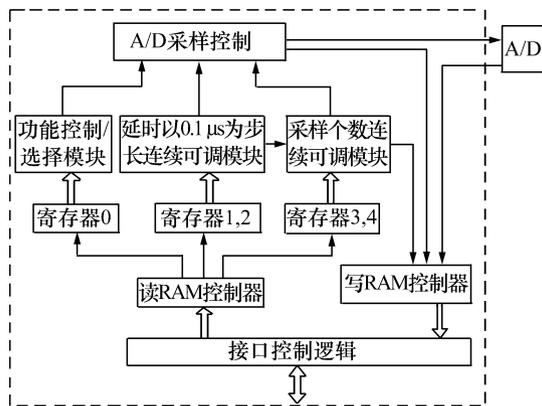


图5 CPLD 内部工作原理

Fig. 5 Internal working principle of CPLD

RAM 相连,既要从双口RAM中读取指令字,又要将A/D转换的数据写到双口RAM中,这里采用了双向总线。CPLD总共需要读入5个8 bit的数据,并将读入的数据分别存储到寄存器0~寄存器4。其中寄存器0的bit7,用‘1’来表示测量一组数据,‘0’表示测量10组数据;bit3~bit0表示采用13种采样频率中的一种,其中最高采样频率为48 MHz,最低采样频率为5 859.375 Hz。寄存器1、寄存器2表示采样个数,寄存器2表示数据的高8位,寄存器1表示数据的低8位。VHDL采用的描述方法是,加法计数到0FFFFh时,产生计数完成信号,停止计数。初始值的计算方法是:65535-(采样个数×6),这种计算方法与内部采用间接对采样脉冲计数方法有关。寄存器3、寄存器4表示延迟时间 t_d 的大小,寄存器4是高位,寄存器3是低位。延迟时间的分辨率是1 μs,其初值的计算方法是:65535-延迟时间(μs)。在每次启动CPLD工作时,都要先将这5个寄存器赋上正确的值,才能正常工作。在完成荧光强度测量的功能时,通过对采样个数和采样频率的控制就能够实现对采样门宽 Δt 的控制。经过认真的分析,CPLD内部逻辑框图如图5所示。

5 实验结果及讨论

在实际操作中被测物荧光寿命未知的情况下,通过选择不同采样频率、采样个数及延迟时间

进行测量,直到得出最满意的结果。图6给出使用不同的采样频率测量Tb晶体的荧光光谱图。

图6(a)测量参数如下:激发光波长337.1 nm,延迟时间 t 为200 μs ,采样频率选择6 MHz,门宽 Δt 选择5 μs ,波长分辨率为1 nm。纵轴为Tb晶体的相对荧光强度值(V),横轴为中心波长(nm)。

图6(b)测量参数如下:激发光波长

337.1 nm,延迟时间 t 为200 μs ,采样频率选择1.5 MHz,门宽 Δt 选择20 μs ,波长分辨率为1 nm。

对比图6(a)和图6(b)可以得出如下结论:随着采样频率的增加,光谱图像的精细结构更加清晰;但是采样频率越高,产生的数据量就会越大,因此要兼顾采样频率和采样个数,以达到最好的效果。

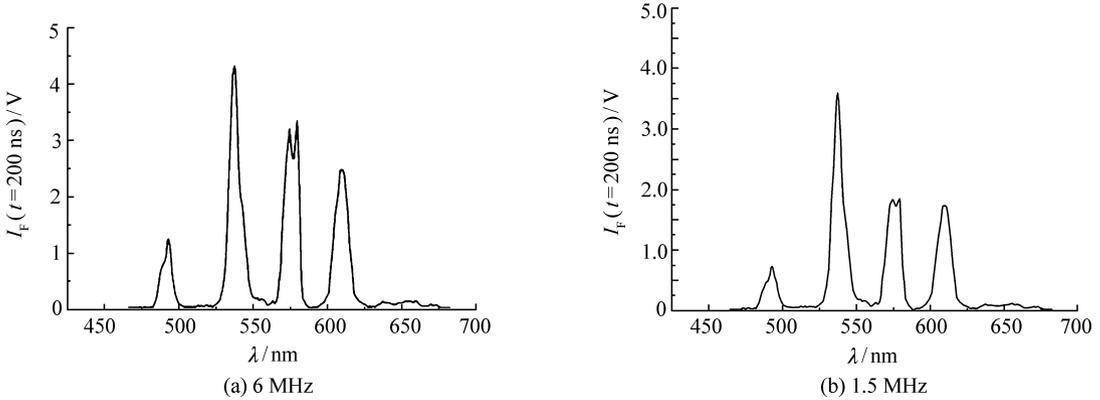


图6 Tb晶体的荧光谱图

Fig. 6 Fluorescence spectra of Tb crystal

6 结论

在本文设计的数据采集系统中,CPLD通过双口RAM从单片机接收指令字,能够选用13种采样频率中的一种控制A/D工作;采样个数在1~8192内任意设置;延迟时间可根据需要在1~

65535 μs 内调节,分辨率为1 μs 。该系统体积小,使用方便,获取和处理数据简单,能够很好地适应大范围荧光寿命的精细检测。

然而受到运算放大器的带宽,A/D转换器件速度的限制,该系统还不能测量所有纳秒量级的信号。今后随着硬件水平的改善,系统有望进一步升级。

参考文献:

- [1] 潘利华,谢文兵,徐经纬. 新型固相时间分辨荧光免疫分析螯合剂合成[J]. 科技创新与品牌,2008,11:30-31.
PAN L H, XIE W B, XU J W. Synthesis and characterization of a novel chelate for solid-phase time-resolved fluorescence immunoassay[J]. *Sci. Technology Innovations and Brands*, 2008, 11: 30-31. (in Chinese)
- [2] 郑蔚,黄志伟,谢树森,等. 时间分辨光谱法用于离体人肺鳞癌、腺癌及正常组织的荧光寿命测量[J]. 光谱学与光谱分析,1997,17(3):20-23.
ZHENG W, HUANG ZH W, XIE SH S, *et al.*. Fluorescence lifetimes of squamous carcinoma, adenocarcinoma and normal human lung tissues *in vitro* by time resolved fluorescence[J]. *Spectroscopy and Spectral Anal.*, 1997, 17(3): 20-23. (in Chinese)
- [3] 阎吉祥,李家泽. 激光诱导荧光寿命及其测量[J]. 光学技术,1997,28(2):77-83.
YAN J X, LI J Z. Laser induced fluorescence lifetime and its measurements[J]. *Opt. Technique*, 1997, 28(2): 77-83. (in Chinese)
- [4] 孙康明,袁祥辉. 基于CPLD技术的数据采集系统研究[J]. 光学精密工程,2004,12(4):167-170.

- SUN K M, YUAN X H. Study of data acquisition system based on CPLD[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2004, 12(4): 167-170. (in Chinese)
- [5] 崔俊杰, 郭宏. 基于 FPGA 的实时数据采集与远程传输系统设计[J]. *数据采集与处理*, 2005, 20(3): 366-370.
CUI J J, GUO H. Design of real-time data acquisition and remote transmission system based on FPGA technology [J]. *J. Data Acquisition Processing*, 2005, 20(3): 366-370. (in Chinese)
- [6] 王忠东, 王立田. 农药荧光寿命测试系统的原理与设计[J]. *应用光学*, 2005, 26(6): 28-31.
WANG ZH D, WANG L T. Principle and design of a test system for pesticide fluorescence lifetime[J]. *Appl. Optics*, 2005, 26(6): 28-31. (in Chinese) 查

作者简介:张未来(1976—),男,湖北宜昌人,硕士研究生,主要研究方向为高速数据采集与处理。

E-mail: dijirongteacher@sina.com

宋克非(1967—),女,吉林人,研究员,主要从事微弱信号检测及航天遥感测量仪器的研究。

E-mail: songkf@sina.com