

共聚焦生物芯片扫描仪中 PMT 电流增益的自动控制*

王立强 陆祖康 倪旭翔 郑旭峰 李映莹

(浙江大学国家光学仪器工程技术研究中心, 杭州 310027)

摘要 根据共聚焦生物芯片扫描仪获得的图像, 设计了计算机控制下的 PMT 电流增益自动控制系 统. 根据计算生物芯片图像的灰度分布与期望灰度分布的差异, 得到期望灰度分布时 PMT 的期望电 流增益, 进而获得 PMT 的期望控制电压. 一个 12 位数模转换器产生期望控制电压, 自动控制 PMT 电 流增益的调节, 控制电压精度高达 2 mV. 实验结果表明, 所设计的 PMT 电流增益自动控制系 统可快速、准确地实现 PMT 电流增益调节, 并具有稳定性高、抗干扰能力强的特点.

关键词 生物芯片扫描仪; 光电倍增管(PMT); 图像处理; 增益

中图分类号 TN152.1 **文献标识码** A

0 引言

生物芯片技术是 90 年代中期发展起来的一项尖端生物技术, 该技术将大量的生物大分子甚至生物样品有序地固定于基片表面, 形成密集的二维生物分子阵列, 然后与已荧光标记的待测生物样品进行杂交反应, 通过生物芯片扫描仪来检测分析荧光信号的强度, 从而获得待测生物样品信息. 生物芯片技术可广泛应用于药物研究、疾病诊断、基因结构与功能研究等领域^[1,2].

共聚焦生物芯片扫描仪采用光电倍增管(PMT)作为荧光探测器, 具有高分辨率、高灵敏度的优点, 但由于不同的生物芯片之间荧光信号也有所变化, 要获得较为满意的扫描图像, 就必须根据实际情况调节 PMT 的电流增益. 若 PMT 的电流增益不可调, 则当生物芯片的荧光信号较弱时, 扫描得到的图像亮度偏低, 不利于观察分析, 而当生物芯片的荧光信号较强时, 又会使扫描得到的图像亮度偏高, 甚至饱和, 不仅不利于观察分析, 严重时还会造成 PMT 因阳极输出电流过大而损坏. 因此, 在共聚焦生物芯片扫描仪中, PMT 的电流增益控制就显得格外重要. 目前共聚焦生物芯片扫描仪中 PMT 的电流增益调节大多采用交互式人工调节方法, 由于缺乏预测性, 往往需要经过多次增益调节才能达到预期的效果.

本文介绍一种应用于共聚焦生物芯片扫描仪中的 PMT 电流增益的自动控制调节系统. 该系统采用数字图像处理技术, 对扫描仪获得的生物芯片图像进行灰度分布分析, 预测出当前 PMT 电流增益控制电压与期望 PMT 电流增益控制电压的差值, 通过

一次增益调节就能达到预期的效果.

1 原理与方法

1.1 PMT 电流增益控制的原理

PMT 的电流增益 G 与其工作电压 V 紧密相关, 可以由下面方程表示^[3]

$$G \propto V^{kn} \quad (1)$$

式中 k 是由 PMT 电极构造和材料决定的常数, 典型值为 0.7~0.8, n 为 PMT 的倍增级数. 由式(1)可知, PMT 的电流增益与工作电压的 kn 次方成正比, 所以要对 PMT 电流增益的精确控制, 就必须精确控制 PMT 的工作电压.

图 1 为本系统中选用的 PMT 结构框图, 它是 Hamamatsu 生产的 H7712-04, 其工作电压可由一个控制电压调节, 控制电压的调节范围为 0 V~1.2 V, 其电流增益与控制电压之间的曲线关系如图 2 所示.

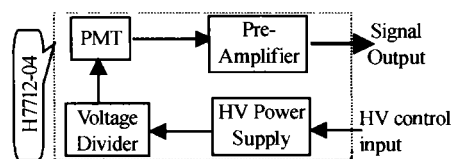


图 1 H7712-04 PMT 模块内部框图
Fig. 1 The diagram of H7712-04 PMT module

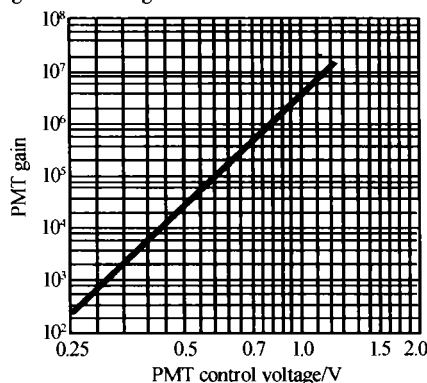


图 2 H7712-04 控制电压与增益关系
Fig. 2 The relationship between the control voltage and PMT gain of H7712-04

*国家重点自然科学基金项目 30227002 资助
Tel:0571-87951213 Email:wangliqiang@zju.edu.cn
收稿日期:2003-04-14

根据这个曲线,只要准确地实现了控制电压的调节,就实现了对 PMT 电流增益的准确调节.

1.2 PMT 电流增益的自动控制方法

PMT 电流增益自动控制调节系统的原理图如图 3 所示. PMT 的输出信号经数据采集卡 PCI9111HR 进行模数(A/D)转换,获得生物芯片荧光信号的原始数据,计算机首先根据此原始数据重建生物芯片图像,紧接着对重建的图像进行低通滤波处理,以滤除图像中的噪声. 图像的灰度分析主要是计算图像的灰度直方图,以得到图像中目标区域的灰度分布,同时,目标区域在计算机中预先设置有期望的灰度分布,根据期望灰度分布与当前灰度分布的差值,就可以得到当前 PMT 增益与期望增益的差值,进而就得到了当前 PMT 控制电压与期望控制电压的差值. 此时,计算机控制数据采集卡的数模(D/A)转换,产生期望的 PMT 控制电压,此控制电压就可以调节 PMT 的增益至期望值.

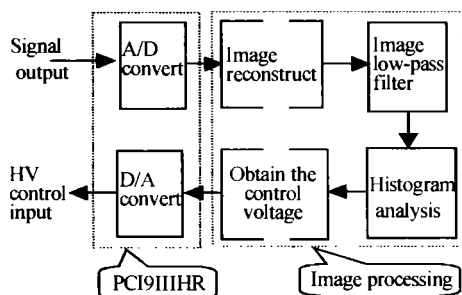


图 3 PMT 自动增益控制调节系统图

Fig. 3 The system of PMT auto gain control

在此控制方案中,生物芯片图像的低通滤波处理不能缺省,因为图像中的噪声会对后续的灰度分析产生较大影响,甚至会造成灰度分析发生错误,进而使得 PMT 的自动增益调节发生错误.

2 自动增益控制算法的实现

2.1 图像的直方图分析

图像的灰度统计直方图是一个一维离散函数^[4]

$$p(s_k) = n_k/n \quad (k=0,1,\dots,L-1) \quad (2)$$

式(2)中 s_k 为图像的第 k 级灰度值, n_k 是具有灰度值 s_k 的像素的个数, n 是图像像素总数. 图像的直方图给出了一幅图像所有灰度值的整体描述.

图 4 是计算机根据 PCI9111HR 模数转换重建的生物芯片图像,为 16 位灰度的 TIFF 格式. 在计算此图像的直方图前,采用 5×5 模板对图像进行了中值滤波处理,以去除图像中的噪声影响. 采用中值滤波处理生物芯片图像有如下优点:可以很好消除孤立的噪声点;可以在消除噪声的同时产生较少的模糊.



图 4 重建的生物芯片扫描图像

Fig. 4 The reconstructed image of the biochip

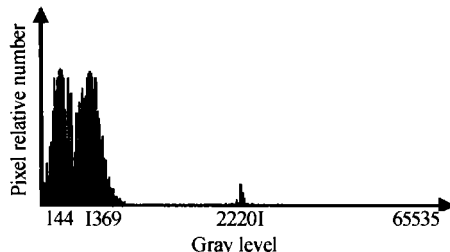


图 5 图 4 中图像中值滤波之后的灰度分布直方图

Fig. 5 The gray-level histogram of the image in Fig. 4 after median filtering

图 5 是图 4 中图像在中值滤波后的灰度分布直方图,可以看到直方图中有三个峰值,分别对应生物芯片图像中的背景、目标区域及目标区域内的分子点阵.

根据直方图,可以判断出图像中背景的灰度集中分布在 144 左右,目标区域的灰度集中在 1369 左右,分子点阵的灰度集中在 22201 左右.

由图 4 的原始生物芯片图像与图 5 的灰度分布直方图均可以看出,当前扫描获得的生物芯片图像偏暗,即 PMT 的增益偏低. 若目标区域预先设置的期望灰度应集中在 3000 左右,则 PMT 增益应提高 $3000/1369 = 2.2$ 倍,此时分子点阵的灰度将集中在 $22201 \times 2.2 = 48842$ 左右.

2.2 增益控制电压的获得

由上面直方图分析可知,此时 PMT 的期望增益是当前增益的 2.2 倍. 由于 PMT 控制电压与 PMT 增益存在如图 2 所示的对应关系,因此,只要根据图 2 中的曲线,就可以方便的从期望增益值算出期望控制电压.

为了快速、准确地获得期望控制电压,对图 2 曲线进行离散化处理,将控制电压在 0.5 V ~ 1.2 V 之间的曲线每 2 mV 采样一个增益值,这样共有 350 个数据点以表格的形式记录在计算机中. 因为 PCI9111HR 数据采集卡上的 D/A 转换器为 12 位精度,电压控制精度可达到 2mV 以上,这样就可以根据查表算法准确地产生 PMT 增益控制电压.

图 4 中的图像是在 PMT 控制电压为 0.7 V 时扫描得到的,此时 PMT 的增益为 3.25×10^5 ,期望 PMT 增益为当前增益的 2.2 倍,为 7.15×10^5 ,通过

查表,可以得到最为接近的期望控制电压为0.776V.

3 实验结果与分析

在调整 PMT 的控制电压至期望电压 0.776V 后,重新扫描得到的生物芯片图像如图 6 所示.可以看出,图像的目视效果与期望结果很吻合.

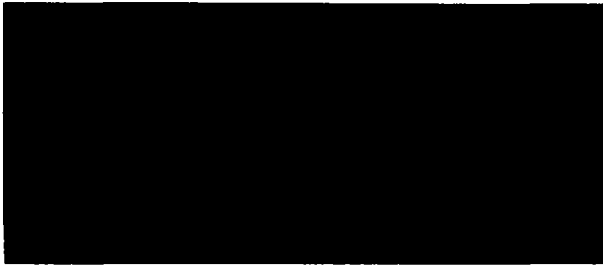


图 6 经过自动增益调整后扫描得到的图像
Fig. 6 The image after auto gain adjustment

如果 PMT 的初始增益值过大,扫描得到的生物芯片图像将出现一定程度的饱和,此时,利用本系统的自动增益控制算法,也可以很好的实现 PMT 增益的自动调节.

图 7 中(a)图为同一个生物芯片在 PMT 增益过大时扫描得到的图像,(b)图是经过自动增益调整后重新扫描得到的图像,可以看出,(b)图与图 6 效果很接近,表明本系统自动增益控制算法很成功.

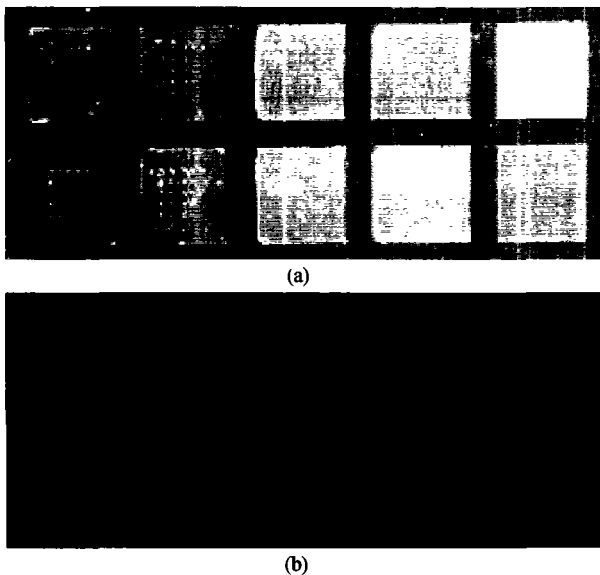


图 7 PMT 增益过大时扫描得到的图像(a)及经过自动增益调整后得到的图像(b)

Fig. 7 The image (a) is reconstructed when PMT in high gain and (b) is the image after auto gain adjustment

图 8 是 PMT 的不同初始增益控制电压与自动增益调整后控制电压的曲线,可以看出,当 PMT 初始控制电压变化在 0.5 V ~ 1.2 V 之间时,本系统均可以准确地获得期望控制电压,控制电压误差在 ± 2 mV 之内.

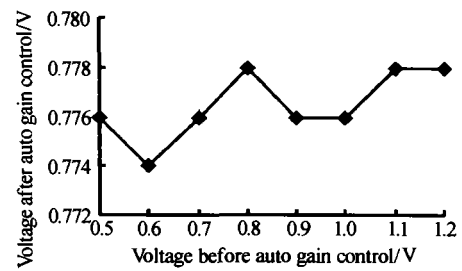


图 8 PMT 初始控制电压与自动增益调整后得到的期望控制电压

Fig. 8 PMT's initial control voltage and the voltage after auto gain control adjustment

本系统所设计的 PMT 电流增益自动控制系统主要应用在共聚焦生物芯片扫描仪中,它不仅可以快速、准确地实现 PMT 增益的自动调节,而且还有以下几个优点:

1) 减少生物芯片的激光扫描次数,减少了荧光漂白(bleaching)和淬灭(quenching)概率.如果采用常规增益调节方法,往往需要多次反复调节,这样会导致生物芯片的杂交荧光信号减弱.

2) 减少了 PMT 处于高工作电压下的几率,延长了 PMT 的使用寿命,增益控制电压由数模转换器实现,调节精度高,抗干扰性能强.

3) 有利于生物芯片检测分析的全自动化操作.

4 结论

在分析生物芯片扫描图像灰度分布直方图的基础上,设计了一种能自动控制 PMT 增益的系统.根据图像直方图中目标区域当前灰度分布与期望灰度分布的差值,获得当前 PMT 增益控制电压与期望控制电压的差值,由数模转换器产生期望控制电压,调节 PMT 的增益至期望值.本设计方案可快速、准确地实现共聚焦生物芯片扫描仪中 PMT 的自动增益控制,而且具有自动化程度高、抗干扰性能强的优点.

参考文献

- 1 Ye R W, Wang T, Bedzyk L, *et al.* Applications of DNA microarrays in microbial systems. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 47(3): 257 ~ 272
- 2 Dhiman N, Bonilla R, O' Kane J D, *et al.* Gene expression microarrays: a 21st century tool for directed vaccine design. *Vaccine*, 2002, 20(1-2): 22 ~ 30
- 3 缪家鼎,徐文娟,牟同升. 光电技术. 杭州:浙江大学出版社, 2002. 70 ~ 92
- 4 Miao J D, Xu W J, Mou T S. *Photoelectronic Technology*. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2002. 70 ~ 92
- 4 章毓晋. 图像处理和分析. 北京:清华大学出版社, 2001. 72 ~ 82
- Zhang Y J. *Image processing and analysis*. Beijing: Tsinghua University Press, 2001. 72 ~ 82

Auto Gain Control of the PMT used in Confocal Biochip Scanner

Wang Liqiang, Lu Zukang, Ni Xuxiang, Zheng Xufeng, Li Yingsheng
CNERC for Optical Instrument, Zhejiang University, Hangzhou 310027

Received date: 2003-04-14

Abstract An auto gain control system of photomultiplier tube (PMT) used in confocal biochip scanner is designed and performed according the scanning image's gray level distribution. The biochip image's histogram is calculated and contrasted with the target histogram, the target gain of the PMT is obtained by the difference of the two histograms and the target control voltage is calculated by the target gain of the PMT. The target control voltage is generated using a 12-bit digital to analog converter (DAC) automatically, the precision of the control voltage is 2mV. As a result, the gain of the PMT is controlled automatically too. The experiments prove that the proposed auto gain control system can control the gain of PMT quickly and accurately, at the same time, the proposed auto gain control system is very strong in stability and anti-EMI.

Keywords Biochip scanner; Photomultiplier tube (PMT); Image processing; Gain

Wang Liqiang was born in 1977. He got his B. E. and M. E. from Zhejiang University in 1998 and 2001 respectively. Now he is working for his doctorate degree in Optical Engineering Department of Zhejiang University and his research field is biomedical optics.

