

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-023

面向自动化铸造平台的多功能微孔板检测系统

马翠^{1,2}, 杨凡^{1,2}, 张君泰^{1,2}, 何凯^{1,2}

(1 中国科学院深圳先进技术研究院, 广东 深圳 518055; 2 深圳市精密工程重点实验室, 广东 深圳 518055)

摘要: 生物分析技术正向高通量、高灵敏度、多功能方向发展, 微孔板检测仪作为高通量分析的基础仪器, 需要满足微量化、自动化、集成化的要求。目前国内单一功能的微孔板检测仪器技术成熟, 检测精度已与国际水平相当, 但多功能的微孔板检测仪还较少, 大多使用进口仪器。进口产品价格昂贵, 有些操作指令不公开, 不易集成到自主研发的合成生物自动化铸造平台项目。本研究将对高精度吸光度检测和高灵敏度荧光检测等关键技术进行研究, 开发具有吸光检测和荧光检测功能的微孔板检测仪, 并自主开发控制系统及数据采集分析软件, 使其易于接入自动化铸造平台。该微孔板检测仪结构紧凑, 吸光检测和荧光检测模块独立, 波段可扩展。通过实验测试, 所研发的微孔板检测仪的吸光度检测重复性为0.3%, 10 s内可完成96孔的吸光检测; 荧光检测数据在皮摩尔浓度范围内线性度较好, 对荧光素钠溶液的检测灵敏度大约3.9 pmol/L。此外, 该系统可通过串口直接连接自动化平台集成控制系统, 也可通过TCP方式进行远程通信控制。

关键词: 微孔板; 自动化平台; 吸光度; 荧光检测

中图分类号: TH773; Q819 **文献标志码:** A

Multifunction microplate reader for automated foundry platform

MA Cui^{1,2}, YANG Fan^{1,2}, ZHANG Juntai^{1,2}, HE Kai^{1,2}⁽¹⁾Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China;⁽²⁾Shenzhen Key Laboratory of Precision Engineering, Shenzhen 518055, Guangdong, China)

Abstract: Bioanalytical technology is being developed towards the direction of high throughput, high sensitivity and multi-functionality. Microplate readers serve as fundamental instruments for high-throughput analysis. They need to meet the requirements of microanalysis, automation and integration. At present, domestic instruments have limitations in terms of functionality and automation. Although the single-function microplate reader has basically reached the level of oversea equivalents, there is still a gap in the multifunctional instruments. Most of the multi-function microplate reader used are imported instruments. They are usually expensive and some operating instructions are not fully disclosed. It is difficult to integrate them into the automated foundry platform. In this study, we will research key technologies of high-precision absorbance detection and high-sensitivity fluorescence detection, and develop a

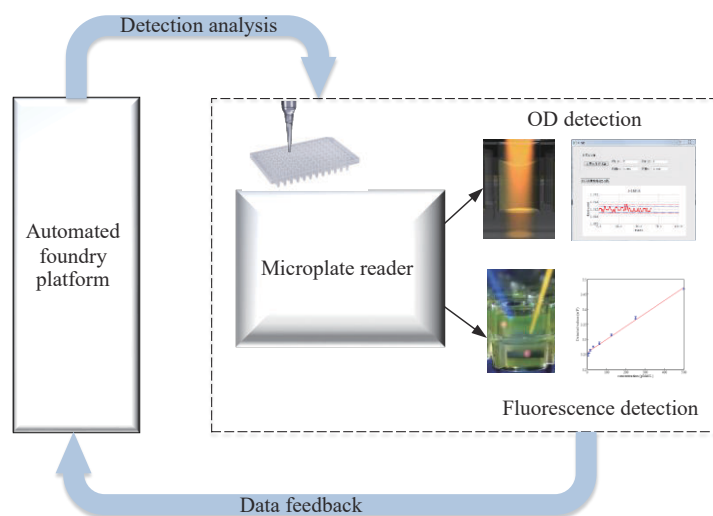
收稿日期: 2023-03-16 修回日期: 2023-07-11

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0902904)

引用本文: 马翠, 杨凡, 张君泰, 何凯. 面向自动化铸造平台的多功能微孔板检测系统[J]. 合成生物学, 2023, 4(5): 1036-1049

Citation: MA Cui, YANG Fan, ZHANG Juntai, HE Kai. Multifunction microplate reader for automated foundry platform[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4 (5): 1036-1049

multifunction microplate reader. The control and soft system is also developed independently to access the automated foundry platform. In our system, the absorbance optical system includes light source, filters, fibers and lens array. Multiple channels of transmitted light are detected in parallel to improve the speed of detection. Combined with the one-dimensional movement of microplate, the whole 96 wells are measured. The fluorescence optical system mainly includes LED light source, filter cube (emission filter, excitation filter and dichroic mirror) and photodiode detector. Single channel of excitation light is detected and two-dimension scanning mechanism is realized for the whole microplate measurement. Besides the optical system, high precision data acquisition system is developed, including signal amplifying, conditioning and isolating circuit. This microplate reader is compact with independent absorbance and fluorescence modules, and scalable wavebands. According to experimental results, the reproducibility of absorbance measurement is high with a standard error of 0.3% and the total 96 micro-wells can be detected accurately within 10 seconds. The fluorescence detection has good linearity in the picomole concentration and the limit of detection for sodium fluorescein is about 3.9 pmol/L. For synthetic biology automated foundry platform, this microplate reader can be directly connected to the integration control system through serial port, and can also be remotely controlled by TCP communication.



Keywords: microplate; automation platform; optical density; fluorescence detection

目前生物分析技术正向高灵敏度、小剂量、高通量、多功能等趋势发展,以微孔板为载体的多功能微孔板检测仪是合成生物实验中的必备仪器。微孔板是一种高通量反应容器,常用的96孔板每孔的容量大概是365 μL ,单次检测所需的溶液体积小且可多孔批量检测,利用它可以提高检测速度并降低检测成本。微孔板读板机、酶标仪是针对微孔板的检测仪器,广泛应用于生物医药检测^[1-4]。该类仪器最早是由BioTek公司(现已归入Agilent公司)生产研制,极大地提高了生化分析的工作效率。后来Molecular Devices、Tecan、

PerkinElmer、Thermo Scientific等公司也逐渐推出了具有动力学检测功能、温控功能、振板功能的酶标仪和微孔板检测仪,这些仪器可进行吸光度检测、荧光强度检测、荧光偏振检测、化学发光检测等,性能逐渐完善,功能也不断扩充。多功能微孔板检测仪几乎被这些国外知名仪器厂商所垄断,典型的有Agilent Biotek的Synergy系列^[5]、Molecular Devices公司的SpectraMax系列^[6]、Tecan公司的Infinite系列^[7]等。在仪器研制方面,国内很多高校和研究机构也开展了相关方面的研究。如山东药学院于学龙等^[8]研制了多通道

的吸光度检测酶标仪, 12通道同时检测, 带温控功能; 苏州大学林学源等^[9]增加参比光路, 研制高分辨率酶标仪; 上海交通大学的朱家亮等^[10]研制基于嵌入式系统的小型酶标仪; 浙江大学王宇等^[11]研制荧光/发光检测的多功能分析仪; 华南理工大学的李强等^[12]研制多功能荧光分析仪; 杭州电子科技大学的周鹏飞等^[13]研制了一套多功能微孔板分析仪样机, 包括吸光度、荧光、化学/生物发光检测; 中国科学院大连化学物理研究所的耿旭辉团队^[14-15]研发了小型高精度的荧光检测模块, 达到同等仪器国际先进水平。国内的研究虽然取得了不少成绩, 但产业化的产品还不多。国内公司生产的酶标仪基本都只包含吸光度检测功能, 虽然也有相关的荧光PCR仪、发光分析仪等, 但单机功能相对单一, 自动化水平不高。

合成生物学自动化铸造平台将工业4.0的理念引入实验室, 用自动化机器代替人。通过集成软硬件技术实现生物材料的自动化合成, 代替研究人员进行海量的工程化试错实验, 提升实验效率和操作精度^[16]。微孔板检测仪作为自动化平台中广泛使用的一种检测设备, 需要能够集成在自动化控制系统中。进口产品价格昂贵, 操作复杂, 且其控制指令自成体系, 接口通常不开放, 不易集成; 国内已有设备仪器功能相对单一, 同时也需要进行改造才能集成应用于自动化铸造平台。

本研究面向合成生物学研究中对微孔板检测仪的广泛需求, 研究高精度吸光度检测和高灵敏度荧光检测等关键技术, 开发具有吸光度检测和荧光检测功能的紧凑、经济型微孔板检测仪, 并自主开发控制系统及采集分析软件, 使其易于接入合成生物自动化铸造平台。

1 系统基本原理

作为合成生物自动化铸造平台的组成部分, 微孔板检测系统必须实现全自动操作, 包括进样的自动化以及检测的自动化。系统发送指令, 机械臂将待检测微孔板放置在检测平台上, 放置完成后机械臂收回, 仪器盖自动关闭, 系统自动执行检测功能; 当检测完成后仪器盖自动打开, 机械臂取出检测完成的微孔板, 进行下一步操作。

按功能模块设计, 多功能微孔板检测系统的硬件部分可以分为吸光度检测模块、荧光检测模块、控制模块、光源模块、电源模块、仪器盖自动开闭及微孔板进给模块, 如图1所示。其中, 吸光度和荧光检测模块主要包括吸光度和荧光检测的光路系统, 包含光源、探测器、滤光片、准直镜、聚焦镜等光学器件。控制模块需要完成微孔板机构的运动控制、仪器盖的自动开闭机构运动、数据的采集与处理、信号的传输通信等。

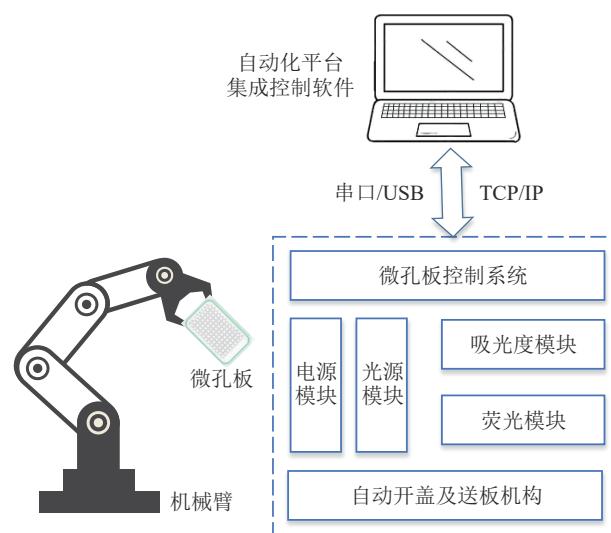


图1 微孔板检测仪主要模块

Fig. 1 Main modules of microplate reader

2 系统开发

微孔板检测系统具有吸光度检测、荧光检测两种模式, 分别对应不同的波长种类和不同的光学结构, 可独立运行。

2.1 光路结构

2.1.1 吸光检测模块

微孔板吸光度的检测与分光光度计类似^[17], 均是基于朗伯-比尔定律, 当一束单色光照射于介质表面, 通过一定厚度的介质后, 光会被吸收一部分, 透射光会减弱。介质的厚度和浓度越大, 光强减弱就越明显。吸光度或光密度OD (optical density) 可以用公式表示如下:

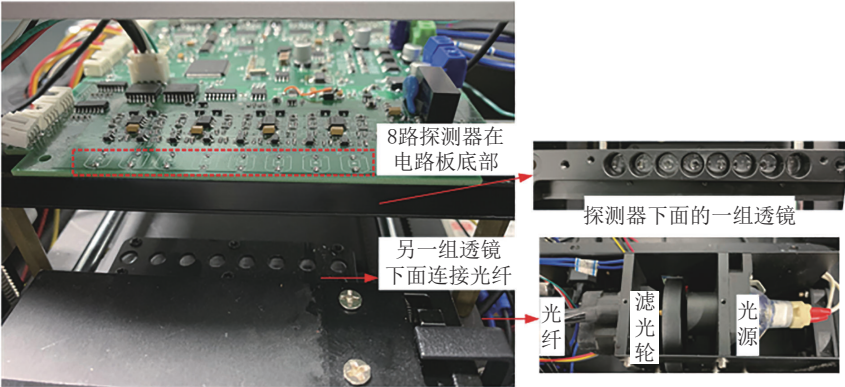
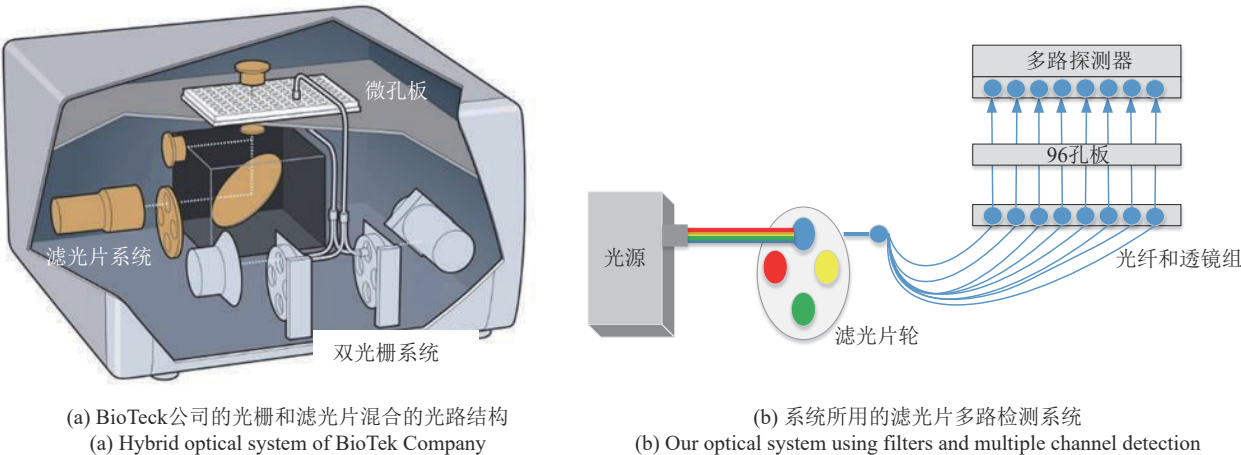
$$OD = \lg \frac{I_0}{I_t} = \lg \frac{1}{T} = Klc \tag{1}$$

式中，OD为光密度或吸光度； I_0 为入射光强； I_t 为透射光强； T 为透过率； K 为摩尔系数或吸收系数； l 为吸收介质的厚度； c 为物质浓度。

光源模块输出的光经过微孔板样品后，进入吸光度检测光路。物质对不同波长的光具有不同的吸收能力，检测吸收能力需要用单色光。单色光通常有两种实现方法：一是单色仪分光，可以任意选择波长，波长范围宽准确性高，但光能损失会较大；二是采用滤光片方式得到单色光，波段数量有限，但滤光片相对更便宜，光能损失小。不同的光学系统都有各自的优点和局限，目前市面上的微孔板检测仪均采用光栅单色仪或滤光片来实现。具有代表性的是Agilent BioTek公司提出了Hybrid混合技术^[18]，将两种光学系统结合，可以实现两种方式的吸光度检测，具有较高的灵活

度。光路系统如图2(a)所示，图中黄色部分是滤光片光路系统，白色标注部分是双光栅的分光系统。该系统灵敏度高，不同光路系统对应不同的应用场景，应用范围广，但结构相对复杂。

这里我们研究紧凑、经济型微孔板检测仪，仅采用滤光片方式，光路结构简单，要得到相同的灵敏度不需要很强的光源。结合滤光片轮得到多个单色光，目前包含4个滤光片（405 nm、450 nm、492 nm、630 nm），后续可扩展。采用8路光路并行检测来提高检测速度，光源发出的光经8条光纤束同时入射到8个样品，经样品吸收后进入检测光路，被8个光电二极管同时接收。检测前经一组透镜组进行聚焦，避免多路信号的相互干扰，检测光路示意图如图2(b)所示。图2(c)是吸光度检测的实物图，光源选用Philips的12 V/24 W 卤钨灯，光纤芯径400 μm，8路探测器均采用滨松的S1133-01，光谱



(c) 吸光度检测模块实物图
(c) Physical image of absorbance module

图2 吸光度检测原理
Fig. 2 Principle of absorbance detection

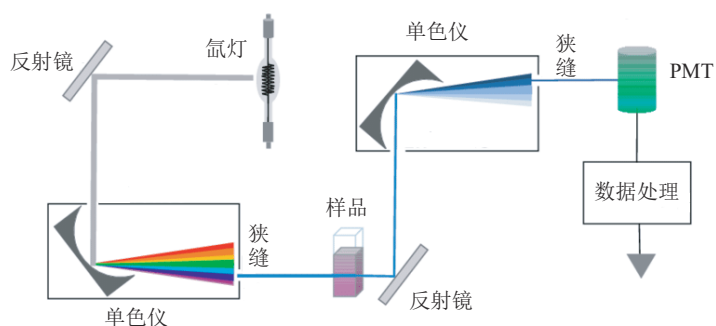
有效范围320~1100 nm, 感光面积2.8 mm×2.4 mm。透镜组之间的间隔与探测器的排列尺寸对应。

2.1.2 荧光检测模块

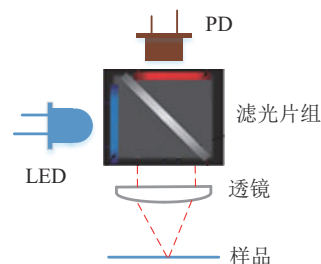
分子受到激发, 吸收光子能量, 从激发态的最低振动能级返回基态时发射特定波长光谱的现象称为荧光。荧光辐射比激发光能量低, 发射的波长比激发光的波长要长。荧光检测技术具有灵敏度高、动态范围宽等优点, 但也容易受环境的影响, 如: 荧光猝灭、光漂白等会对检测产生较大的影响。不同的荧光物质有不同的激发光谱和发射光谱, 可用荧光对物质进行鉴别; 同时在较低浓度下, 荧光强度与样品浓度存在线性变化关系, 荧光检测也可用于物质的定量测定^[19-20]。

荧光检测系统中, 由光源输出光入射到微孔板样品, 激发的荧光信号进入荧光检测光路。光路主要包括激发光路和发射光路, 激发光路是从光源输出光照射到样品, 实现高效激发; 发射光路

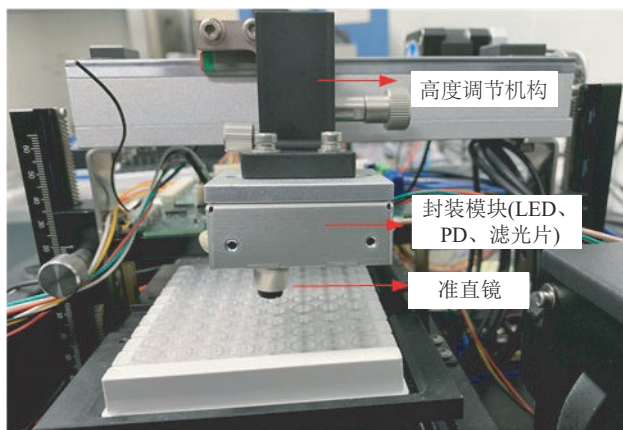
用于检测激发的荧光。荧光信号通常较弱, 常用荧光检测系统中, 光源多采用大功率的氙灯, 探测器采用高灵敏的光电倍增管PMT (photomultiplier), 发射及激发光路均采用单色仪, 可以实现光谱扫描。光路结构如图3(a)所示^[21], 该系统波段范围广, 可得到荧光光谱, 但系统功率高且体积也较大。后来有研究人员研制出小型荧光检测模块, 采用LED光源和光电二极管PD (photodiode) 实现^[22-25], 同样具有较高的检测灵敏度。特别是中科院大连化物所研制的高灵敏度小型荧光模块^[14], 结构紧凑, 精度高。这里我们采用类似的光路结构, 集成小型荧光模块, 减小系统体积, 光路结构如图3(b)所示。为保证激发光信号不会影响荧光信号, 分别采用激发滤光片和发射滤光片来实现。光源经激发滤光片得到窄波段的激发光源, 经二向色镜反射到微孔板样品, 激发荧光后, 荧光经二向色镜和发射滤光片到达探测器上, 即可



(a) 常用的氙灯和PMT荧光检测
(a) Conventional Xenon lamp and PMT optical system



(b) 系统所用的小型LED和PD检测结构
(b) LED and PD optical system used in our system



(c) 荧光检测模块实物图
(c) Physical image of fluorescence module

图3 荧光检测原理

Fig. 3 Principle of fluorescence detection

检测荧光强度。光源采用300 mW的蓝光LED，滤光片选择480 nm和520 nm范围的窄带滤光片，探测器选用LSSPD-1.2。光路末端连接一个5 mm孔径的光纤准直镜，避免光线发散造成较大的孔间干扰。同时，小型荧光模块安装在一维移动机构上，与微孔板的一维运动机构组合实现二维空间扫描检测。此外，镜头相对被测物的距离对检测光强也有较大影响，结构设计时增加距离可调部件用于实验时调节测试。荧光检测部分的实物图如图3(c)所示，荧光光路封装集成在一小盒子里，由于微孔板里的装载样品可能会有不同容量，所需的聚焦位置会不同，这里在底部增加一个准直镜使光线平行。后续也可考虑自动聚焦系统，根据样品溶液的高度调节聚焦位置。

2.2 控制系统

控制系统基于ARM Cortex-M4内核的主控制器STM32F407芯片，包括电源转换模块、步进电机驱动模块、数据采集模块、串口通信等（图4）。

2.2.1 电机驱动控制模块

系统共有4个电机，包括送板位置二维运动的两个电机、滤光片轮控制电机以及自动开盖的控制电机。这里均采用两相步进电机来实现，使用微控制器结合步进电机驱动芯片来驱动电机。每个电机4个端子A+A-B+B-对应控制端的4个端口，通过微控制器端口的电平高低控制电流的导通，通过导通顺序控制转动方向。定时器的时钟频率控制速度，脉冲数控制运行位置，细分部分可以提高位置控制精度。

每个电机均配有光电限位开关，通过光电开关判断电机是否到达零点及限定位置。当发生限

位时产生外部中断传入微控制器，根据中断信号进行停止等操作。

2.2.2 数据采集模块

光学信号的采集需要I/V转换电路、前置放大、增益放大、信号调理、AD转换电路等，还需与数字电路、功率电路进行电气隔离。吸光度检测的是相对初始光强的比值，因此信号放大部分要求不是很高。荧光检测的是发射荧光的强度，荧光信号通常较弱，要得到高的检测灵敏度需要更大的放大倍数。STM芯片内部有AD转换功能，为了提高检测精度，增加外置AD转换模块，特别是荧光溶液的检测精度需要微伏级别，这里采用24位的高精度采集卡。

2.2.3 通信模块

通信模块负责发送接收指令和数据，这里采用串口总线接口设计，利用MAX3232电平转换芯片实现单片机与上位机进行通信。波特率采用19 200 bit/s，包含1个起始位、8个数据位、无校验位、1个停止位。指令主要分为三大类：送板位置控制，吸光度检测，荧光检测。根据串口功能，可自定义串口指令格式（串口指令功能见表1），如：这里以十六进制FA字符作为帧头，功能码自定义，ODOA字符结束。根据定义的指令格式，可与上位机PC端进行通信控制，也可与自动化铸造平台集成控制软件进行通信。

2.3 软件设计

2.3.1 下位机程序

下位机的控制程序在Keil uVision环境下编写，主要实现对电机驱动控制、数据传输、串口通信等，涉及系统时钟设置、定时器TIM设置及中断

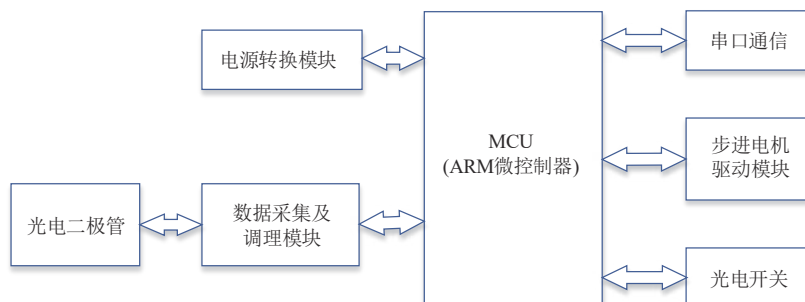


图4 控制系统主要功能

Fig. 4 Functions of control module

表1 串口指令功能表

Table 1 Serial port instructions

送板位置指令	回零位
	吸光检测孔位
	荧光检测孔位
吸光度检测指令	光源(打开、关闭)
	波长选择
	振板(速度、时间)
	单行检测
	整板检测
荧光检测指令	光源强度设置
	光源调试
	单点检测
	整板检测

函数、I/O 配置、外部中断函数、AD 通道配置及 DMA 数据传输设置、串口指令功能等。

以电机驱动控制为例，电机控制主要包括速度、位置、方向，这里我们通过嵌入式程序里的定时器 TIM 时钟频率控制电机运行速度，通过写入的脉冲数控制电机运动的位置，通过改变电机电磁绕组端子 A/B/C/D 的导通顺序控制电机转动方向。驱动控制的流程及主要函数如图 5 所示。

2.3.2 上位机程序设计

上位机程序采用 QT 开发，包括参数设置、吸光度和荧光检测功能、数据处理分析、系统校准，软件主要功能如图 6。

具体的操作界面如图 7。图 7(a)是软件主界面，可以进行参数设置、检测控制。另外，还可在操作界面进行以下操作：

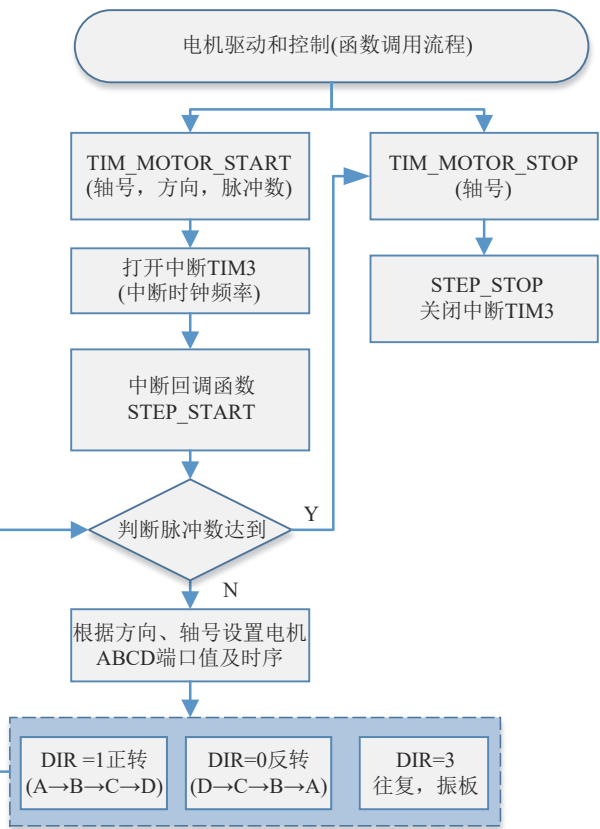


图5 电机的驱动控制程序

Fig. 5 Control program for stepping motor

(1) 显示/隐藏调试信息

点击按钮显示/隐藏调试信息交替显示。显示调试信息，便于查看串口的传输数据。

(2) 检测数据的保存和显示

检测完成后数据自动保存并显示在界面的表格里。数据保存采用两种方式：一种是 CSV 文件，

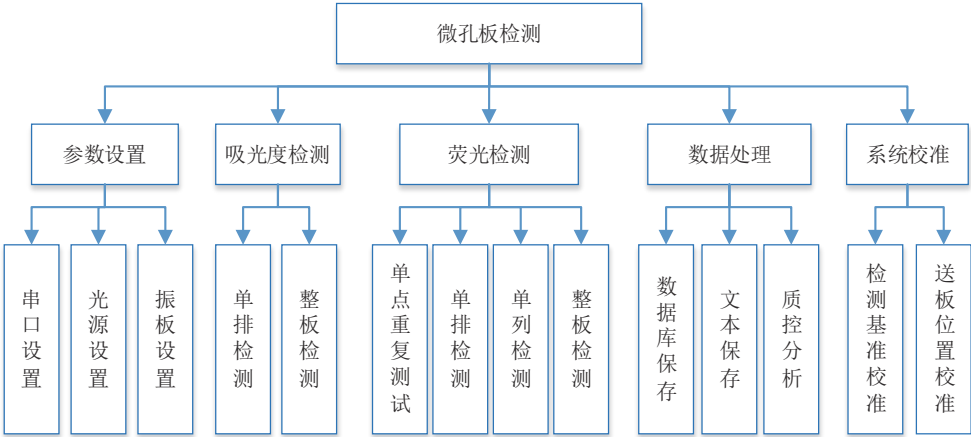


图6 软件功能图

Fig. 6 Software function diagram



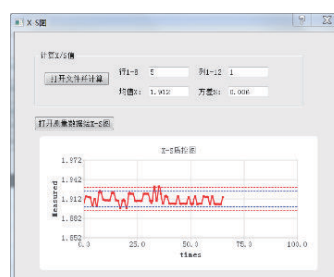
(a) 数据采集主界面

(a) Main interface for data acquisition



(b) 位置校准界面

(b) Interface for position calibration



(c) 数据质控图

(c) Data quality control chart

图7 软件界面

Fig. 7 User interface of software

方便用 Excel 随时查看，文件名以当前时间命名；另一种是数据库文件，可以进行查询、修改等操作，数据库这里选用 SQLite 小型数据库，无需额外的安装与配置。

(3) 校准菜单

校准包括位置校准、检测值的校准。图 7(b) 显示了位置校准界面，位置校准主要是送板位置的偏差校准和滤光轮不同波长位置的校准，若存在位置误差可根据偏差值补偿在实际的运动中。检测值校准针对一些系统固定误差进行补偿，不同波长对应的检测值误差可能不同，具体的校准方法将根据实验数据分析。

(4) 质控图

对检测数据进行统计分析，计算均值 M 和均方差 S ，确定图形中心线、上下控制限、上下辅助线等。如图 7(c)，根据检测值的变化分布可以查看检测值的准确性、稳定性等。按照统计学规律，

检测数值一般要遵循一些规律，如：95% 的结果应落在 $M \pm 2S$ 范围内；均值两侧的数据分布几乎相同，不能有连续多次结果在均值的同一侧，或连续多次数值渐升或渐降。如果准确性变化，数值会出现向上或向下的总体趋势性变化；如果精度变化，会出现数值差异性增大的现象。

2.3.3 自动化铸造平台的连接通信

微孔板检测仪作为合成生物实验中常用的一种检测仪器，需要集成在合成生物自动化铸造平台中，并与集成控制软件通信控制。该系统可以通过两种方式通信：一种是通过串口进行物理连接，直接使用表 1 中的串口指令进行通信，这种方式不需要运行微孔板检测的上位机程序，但需要串口线连接，使用范围有限制；另一种是通过 TCP/IP 协议进行通信，可以远程控制，TCP (transmission control protocol) 传输控制协议是一个用于数据传输的传输层网络协议，一般分为客

户端和服务端，即 C/S（client/server）模型。这里微孔板检测系统作为服务端，集成控制平台作为客户端，通过 QT 的 QTcpSocket 来读取和写入数据。程序运行时，客户端需已知服务端的 IP 地址和端口号，先打开服务端程序，服务端监听客户端发来的连接请求，等连接后可以读取客户端发来的数据报，也可发送数据报。表 2 是自定义的 TCP 通信指令，客户端连接后可通过该指令进行远程控制。图 8 是编写的服务端和客户端测试程序，图 8(a)是微孔板检测仪程序上对应的服务端，图 8(c)对应自动化平台上的客户端程序，经测试两部分程序可以进行远程连接通信。

表2 TCP通信指令

Table 2 Instructions of TCP communication	
客户端指令	功能介绍
#Initial#	初始化回原点
#Abs001#	吸光度检测
#Flu001#	荧光检测
#Open01#	打开盖子
#Close01#	关闭盖子
#Ask001#	查询状态:工作中/结束



图8 TCP通信测试

Fig.8 TCP communication test program

3 实验结果和分析

图 9(a)是样机的外部实物图，图 9(b)是打开上面盖子后的内部结构图。吸光度检测时，96 孔板的一排 8 孔同时检测，送板机构只需要一维来回运动。荧光检测是单点检测，需要增加另一轴的扫描运动。

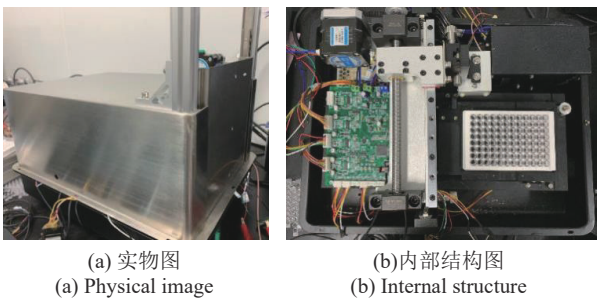


图9 研制样机

Fig.9 Prototype built

为了减小仪器尺寸，设计荧光检测模块在另一方向来回运动，结合送板机构的一维运动实现二维扫描。开盖部分设计为向上的推拉方式，方便机械臂从侧面进行微孔板的拿取和放下。

3.1 吸光度检测

根据计量检定规程 JJG 861—2007 的规定要求，采用中性密度滤光片对微孔板吸光度性能进行重复性检测^[26-28]。实验中采用大恒光电的 GCC 系列中性滤光片。

由于环境、暗电流等影响，在没有光照的情况下，探测器的检测值通常不为 0，故吸光度的计算 [式(1)] 表示为：

$$OD = \lg \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_t - I_{\min}} \tag{2}$$

式中， $I_{\min}$ 是没有光照的情况下的检测值； $I_{\max}$ 是没有检测物的情况下测的光源强度。光源的稳定性随着时间可能会有变化，可以每次测量时先测量光源强度再进行检测，也可以事先测量光源强度保存相关值，定期对光源值进行校准。经检测，不同波长光源的光强值差异较大，每个波段需要单独保存用于计算。为了提高检测速度，这里选用保存光源测量值、定期校准光源的方式，吸光度整板检测一次测量时间小于 10 s。

3.1.1 重复性及准确性测试

选择不同波长的光源，将标称值 OD=1.0 的中性滤光片放在 96 孔架上，如图 10 所示，在滤光片所在的中心孔位重复测量 10 次，计算多次测量 OD 值的平均值 AVE 和标准偏差 RSD（表 3）。

从上表可以看到，4 个波长的测量值标准偏差均小于 0.3%。测量准确性方面，不同波长的光源

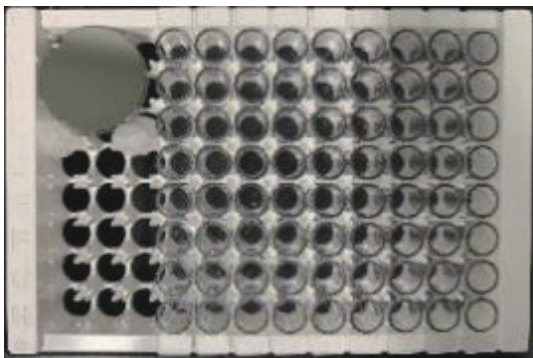


图10 检测中性密度滤光片的OD值
Fig. 10 Neutral filter used for OD test

强度有些差异，测量误差也有些不同，405 nm的示值误差稍大，平均值与标称值的差异为0.035，其他几个波长分别为0.008、0.006、-0.004。由于测量值的重复性较好，考虑补偿方式校正示值误差。测量误差随波长不同有些变化，需对不同波长测量结果分别校正。

除了同一孔位的重复性，不同孔位之间的差异也需要考虑。这里选取同一波长同一滤光片，随机移动滤光片在96孔板上的位置，测量几个不同孔位的重复性，不同孔位用微孔板两个方向的序号代表，测量结果如表4，测量标准偏差同样小于0.3%。后续还需进一步增加测量孔位，并在测量值的校准中综合考虑不同孔位的误差。

3.1.2 线性度测试

为更准确地测量线性度，在中国计量科学研究院购买橙黄G吸光度标准溶液[生化分析仪线性误差校准用溶液GBW(E) 130767-130774]进行线性度测试。不同浓度的溶液分别取100 μL加入透明微孔板的不同孔位，光源采用492 nm波段，吸光度测量值的平均值AVE及标准差RSD如表5。线性拟合曲线如图11所示，拟合方程 $y=0.2739x+0.0434$ ，拟合系数 $R^2=0.9963$ 。由于测量条件不一样，使用的波长及检测工具不同，测量值与标准值数值差异较大，但拟合系数接近1，线性度较好。

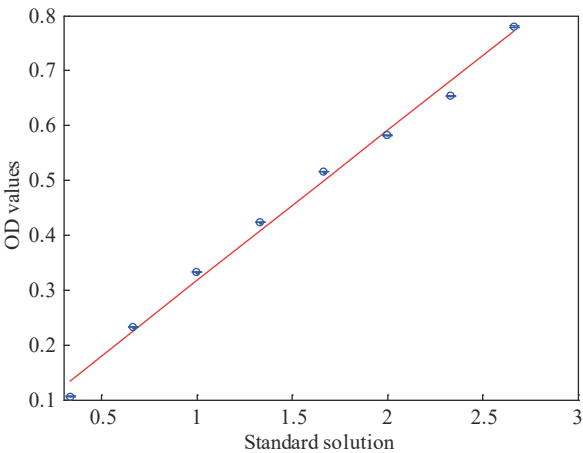


图11 不同浓度溶液吸光度测量值的线性拟合
Fig. 11 Linear fitting of different solutions OD test

表3 不同波长吸光度测量值

Table 3 OD values at different wavelength

波长	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	AVE	RSD
405 nm	0.960	0.964	0.964	0.966	0.968	0.965	0.965	0.965	0.967	0.963	0.965	0.0022
450 nm	0.993	0.993	0.993	0.993	0.993	0.993	0.993	0.993	0.987	0.986	0.992	0.0027
492 nm	0.997	0.999	0.997	0.995	0.997	0.995	0.997	0.995	0.994	0.994	0.994	0.0016
630 nm	1.004	1.005	1.006	1.004	1.004	1.004	1.004	1.002	1.002	1.001	1.004	0.0015

表4 不同孔位吸光度测量值

Table 4 OD values at different position

波长	G2	G4	G6	G8	E2	E4	B2	B4	AVE	RSD
450 nm	1.002	1.001	0.998	0.995	1.001	0.998	1.004	1.000	0.999	0.0026

表5 不同标准溶液的吸光度测量值

Table 5 OD values for different standard solutions

	1	2	3	4	5	6	7	8
标准值	0.333	0.665	0.997	1.330	1.663	1.996	2.332	2.663
测量值 AVE	0.1062	0.2330	0.3332	0.4234	0.5164	0.5821	0.6543	0.7801
测量值 RSD	0.00017	0.00022	0.00030	0.00029	0.00036	0.00037	0.00072	0.00174

3.2 荧光检测

荧光素钠安全无毒，这里我们采用荧光素钠粉末（分子量 376.27）配制荧光素溶液（图 12）测试荧光检测精度，10 mmol/L 的 NaOH 标准溶液作为稀释溶液。主要的仪器工具包括高精度电子秤、移液枪、容量瓶、烧杯、滴定管等。为降低背景干扰，荧光检测选用黑色的 96 孔板。



图 12 配制荧光素钠溶液

Fig. 12 Fluorescein solution

①配制 0.5 mmol/L 荧光素钠溶液：用电子秤量取 0.301 g 荧光素钠，与 1600 mL 的 NaOH 溶液融合。选择该溶液作为母液，用 NaOH 溶液稀释可得到所需浓度的溶液。

②配制 pmol/L 的荧光素钠梯度溶液：首先将 10 μ L 的 0.5 mmol/L 的荧光素钠溶液与 4990 μ L 的 NaOH 溶液混合得到 1 μ mol/L 的溶液；再将 10 μ L 1 μ mol/L 的溶液与 10 mL NaOH 溶液稀释得到 1 nmol/L 的溶液，此后再对半稀释得到 500 pmol/L、250 pmol/L、125 pmol/L、62.5 pmol/L、31.25 pmol/L、15.625 pmol/L、7.8125 pmol/L、3.9063 pmol/L 的溶液。

③用移液枪量取 100 μ L 的不同浓度的溶液分别滴入 96 孔板，连续测量 5 次计算平均值 AVE 和标准偏差 RSD，测量结果如表 6。根据测量的平均值进行线性拟合，这里将稀释所用的 NaOH 溶液作为对照样本，其他浓度的溶液减去对照样本的数值后再进行拟合，如图 13，拟合系数 $R^2=0.9967$ 。当浓度稀释至 3.9063 pmol/L 时，检测值与稀释溶

表 6 荧光素钠溶液检测值

Table 6 Detected values of fluorescein sodium

荧光素钠溶液	1	2	3	4	5	AVE	RSD
500 pmol/L	3.4706	3.4674	3.4709	3.4659	3.4647	3.4679	0.0028
250 pmol/L	3.3776	3.3729	3.3655	3.3739	3.3666	3.3713	0.0051
125 pmol/L	3.3187	3.3176	3.3108	3.3154	3.3125	3.3150	0.0033
62.5 pmol/L	3.2931	3.2819	3.2828	3.2847	3.2893	3.2864	0.0047
31.25 pmol/L	3.2767	3.2738	3.2782	3.2736	3.2775	3.2760	0.0021
15.625 pmol/L	3.2618	3.2625	3.2688	3.2611	3.2659	3.2640	0.0032
7.8125 pmol/L	3.2526	3.2538	3.2550	3.2544	3.2561	3.2544	0.0013
3.9063 pmol/L	3.2516	3.2418	3.2449	3.2504	3.2522	3.2482	0.0046
NaOH 溶液	3.2351	3.2402	3.2443	3.245	3.2455	3.2420	0.0044

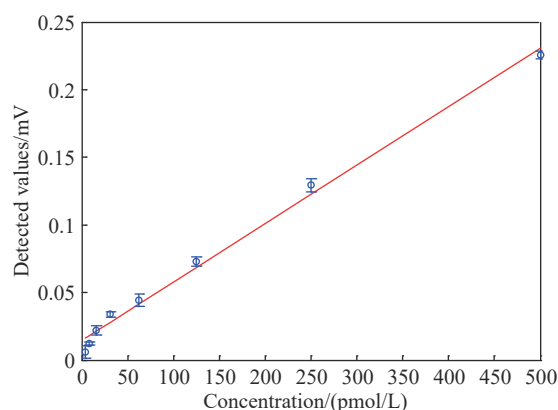


图 13 荧光检测值线性拟合

Fig. 13 Linear fitting of fluorescence detection

液 NaOH 的值接近，基本到达检测限。

此外，为比较不同孔位的检测重复性，用移液枪选取 100 μ L 的相同浓度溶液分别加入 96 孔板的不同孔位。检测结果如表 7，可以看到检测值的标准差相对表 6 明显增加，机构移动时的定位误差会影响光照位置，不同孔位的加样过程也可能会引入部分误差，均会影响检测值。后续还需提高位置控制精度，另外，不同的检测距离、溶液加样量^[29]等对测量结果都会有影响，还需要进一步实验验证选取最佳参数。

3.3 自动化铸造平台的控制测试

实验中采用自动化铸造平台的集成控制软件

表 7 不同孔位的荧光检测值

Table 7 Fluorescence values at different position

溶液	C11	B19	A9	A1	C3	E5	F6	AVE	RSD
荧光素钠	6.5372	6.4458	6.4097	6.4591	6.5018	6.5274	6.5518	6.4904	0.0531

控制机械臂与微孔板检测系统，可以实现对微孔板检测系统的控制。首先，集成控制软件根据 IP 地址和端口号连接设备；然后，机械臂运动到微孔板检测仪所在的位置，如图 14(a)；接着，机械臂将 96 孔板送到检测系统，如图 14(b)；最后，发送命令进行操作并显示当前状态。图 14(c)显示集成控制软件发送#Abs001#进行吸光度检测，目前状态是吸光度检测完成。

3.4 分析比较

本系统研制一种经济、紧凑型多功能微孔板检测仪，根据实验结果与部分国内外仪器进行性能比较。国外的多功能微孔板检测仪种类较多，功能也从单功能、双功能到多功能。这里仅列举

两种：SectralMax Mini作为一种经济型的多功能酶标仪，主要用于检测光吸收、荧光；BioTek Synergy H1 多功能检测仪，采用光栅和滤光片的独特组合光路，可以检测光吸收、荧光强度、荧光偏振、时间分辨率荧光、生物发光、荧光共振 BRET 等，功能强大。国内的酶标仪基本都只包含吸光度检测，选取博科公司最新的BK-EL10D 型号进行对比。光吸收和荧光检测性能比较如表 8，可以看到国内酶标仪在吸光度检测方面已经接近国外水平，但功能相对单一，没有集成荧光、发光检测等功能。本系统研发的微孔板检测仪，是一种紧凑、经济型检测仪器，吸光度检测精度在 0~2.0 范围内较好，荧光检测灵敏度可以达到 pmol/L 级别，与国外的经济型仪器指标已比较接近，但在检测范围方面还有待提高。在自动化兼容方面，

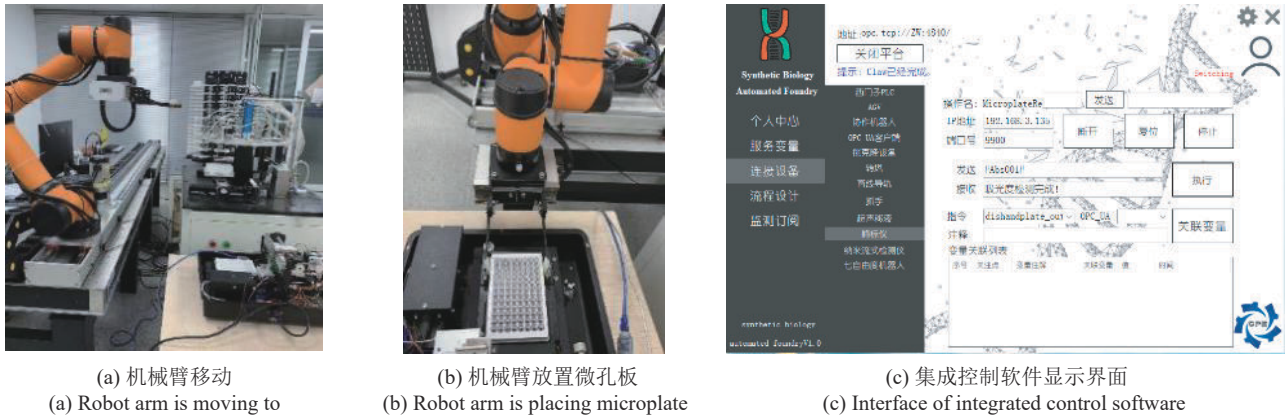


图 14 自动化平台远程控制
Fig. 14 Remote controlled by automated integration platform

表 8 微孔板检测仪性能比较

检测仪	光吸收参数	荧光强度	自动化兼容
SpectraMax Mini 多功能酶标仪 ^[6]	检测范围(OD):0~4.0 误差<1%, OD 0~3.0	灵敏度: 1 pmol/L	无相关介绍
BioTek Synergy H1 多功能微孔板检测仪 ^[5]	动态范围(OD):0~4.0 误差<1%, OD 3.0	灵敏度:0.25 pmol/L(滤光片); 2.5 pmol/L、4 pmol/L(光栅型)	第三方
山东博科公司的 BK-EL10D 酶标仪 ^[30]	读数范围:0~4.5 线性范围(OD):0~3.5 重复性:<0.2% 误差≤±0.01, OD 0.0~1.0 误差≤±0.03, OD 1.0~2.0	无	无相关介绍
本系统检测仪	检测范围(OD):0~3.0 重复性:<0.3% 误差≤±0.01, OD 0~2.0	灵敏度:3.9 pmol/L(荧光素钠)	接口开放,串口或 TCP实现第三方控制

仅 BioTek Synergy 系列提到可以与第三方兼容, 其他型号无相关介绍; 本系统研发设备的接口开放, 已实验测试可以实现自动化平台的远程控制。因此, 该系统研发仪器可以替代国外的经济型多功能酶标仪用于合成生物自动化平台。

4 结 论

本课题组研制了一套经济、紧凑型的多功能微孔板检测系统, 包含吸光度检测和荧光检测功能, 自主设计了控制系统和数据采集处理软件, 可以通过串口和 TCP 方式与自动化平台的集成控制系统进行通信。实验测试验证了系统的可行性及检测的准确性。系统的主要优点有:

①模块化设计, 吸光度模块和荧光模块均可独立控制和运行。吸光度同时检测多路透射光, 一维扫描实现 96 孔板的检测, 整板检测只需 10 s; 荧光检测激发光, 单点高精度检测, 二维扫描实现整板检测。

②系统结构紧凑。荧光检测时, 通过微孔板的一维运动结合小型荧光检测模块的一维运动实现二维扫描, 扫描机构紧凑; 另外, 电机控制采用嵌入式微控制器和电机驱动芯片, 不需要外接驱动器, 节约成本及空间。

③多种接口通信方式, 可串口连接调试控制, 也可远程操作检测。

该微孔板检测系统可以实现吸光度和荧光的检测, 功能基本实现, 但目前还有待改进的地方, 也是后续工作的重点:

①完善软件的数据处理和分析。目前只包含了基本的质控分析, 还需增加测量数据的曲线显示、回归计算、具体生化数据分析等。

②进一步提高检测精度。吸光度检测中, 当透射率较小时测量误差会有所增加, 正在改进数据采集模块, 提高数据的采集精度并提高吸光度的测量范围。荧光检测中, 将进一步进行影响因素分析, 如溶液量、检测距离、放大倍数等, 实验选取最佳参数。此外, 机械运动误差会增加不同孔位之间的检测误差, 还要进一步提高定位精度, 减小整体系统误差。

③便携性设计。小型化、便携性是检测仪器发

展的趋势, 本系统结构紧凑但还有提升空间。如:
a. 减小仪器体积, 开盖机构目前采用向上推拉设计, 增加了仪器高度和重量, 后续考虑改进孔板的进样机构, 让孔板自动向外伸缩, 减小体积; b. 轻量化设计, 目前样机外壳稍重, 后续拟采用轻质材料减小重量, 并进一步优化结构设计, 使其更便携美观。

参 考 文 献

- [1] WALKOWIAK B, KESY A, MICHALEC L. Microplate reader-a convenient tool in studies of blood coagulation[J]. *Thrombosis Research*, 1997, 87(1): 95-103.
- [2] MARESOVÁ L, SYCHROVÁ H. Applications of a microplate reader in yeast physiology research[J]. *BioTechniques*, 2007, 43(5): 667-672.
- [3] WAN Z J, ZHONG L J, PAN Y X, et al. Portable microplate analyzer with a thermostatic chamber based on a smartphone for on-site rapid detection[J]. *Analytical Sciences*, 2017, 33(11): 1291-1296.
- [4] 张国斌. 酶标仪检测技术应用分析[J]. *中国医疗器械信息*, 2021, 27(21): 158-160.
ZHANG G B. Analysis of application of enzyme-plate reader detection technology[J]. *China Medical Device Information*, 2021, 27(21): 158-160.
- [5] Agilent BioTek 产品介绍[EB/OL][2023-03-01]. <https://www.agilent.com/zh-cn/product/microplate-instrumentation/microplate-readers/multimode-microplate-readers>.
Product profile of Agilent BioTek[EB/OL][2023-03-01]. <https://www.agilent.com/zh-cn/product/microplate-instrumentation/microplate-readers/multimode-microplate-readers>.
- [6] Molecular Device 产品介绍[EB/OL][2023-03-01]. <https://www.moleculardevices.cn/microplate-readers/>.
Product profile of Molecular Device[EB/OL][2023-03-01]. <https://www.moleculardevices.cn/microplate-readers/>.
- [7] Tecan 产品介绍[EB/OL][2023-03-01]. <https://lifesciences.tecan.cn/microplate-readers>.
Product profile of Tecan[EB/OL][2023-03-01]. <https://lifesciences.tecan.cn/microplate-readers>.
- [8] 于学龙, 邱秀菊, 张素文, 等. 一种多通道酶标仪的研制[J]. *生物医学工程研究*, 2021, 40(1): 78-82.
YU X L, HOU X J, ZHANG S W, et al. Development of a multichannel enzyme label analyzer[J]. *Journal of Biomedical Engineering Research*, 2021, 40(1): 78-82.
- [9] 林学源. 高分辨率酶标分析仪的研制[D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
LIN X Y. The development of high resolution microplate readers[D]. Suzhou: Soochow University, 2013.
- [10] 朱家亮. 基于 WinCE 的免疫检测酶标仪系统设计与实现[D]. 上海: 上海交通大学, 2012.
ZHU J L. The design and implementation of the system of

- microplate reader by immunoassay based on WINCE[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2012.
- [11] 李强. 全自动多功能荧光分析仪的设计与开发[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- LI Q. The design and implementation of an automatic and multiple function fluorescence analyzer[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [12] 王宇. 多功能分析仪技术研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- WANG Y. The research of multifunctional analyzer technology [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [13] 周鹏飞. 多功能微孔板分析仪设计与实现[D]. 杭州: 杭州电子科技大学, 2015.
- ZHOU P F. Design and implement of multi-function microplate analyzer [D]. Hangzhou: Hangzhou Dianzi University, 2015.
- [14] GENG X H, GAO Y, FENG C B, et al. A facile and high sensitive micro fluorimeter based on light emitting diode and photodiode[J]. Talanta, 2017, 175: 183-188.
- [15] DANG F, GENG X H, LI J M, et al. A miniaturized and high sensitive dual channel fluorimeter based on compact collinear optical arrangement[J]. Talanta, 2020, 211: 120698.
- [16] 陈书. 基于 OPC UA 的合成生物学自动化铸造平台控制系统的研究及开发[D]. 秦皇岛: 燕山大学, 2021.
- CHEN S. Research on control system for synthetic biology automated foundry based on OPC UA[D]. Qinhuangdao: Yanshan University, 2021.
- [17] AKASH M S H, REHMAN K. Introduction to spectrophotometric techniques[M/OL]//Essentials of pharmaceutical analysis. Singapore: Springer Nature Singapore, 2019: 19-27[2023-03-01]. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-1547-7_2.
- [18] ZIMENKOV O, AMOURETTI X, GIFFORD R M, et al. Universal multidetection system for microplates: US8218141 [P]. 2012-07-10.
- [19] LAKOWICZ J R. Principles of fluorescence spectroscopy[M/OL]. 3rd ed. New York: Springer, 2006[2023-03-01]. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- [20] PURNAPATRA S B, PRATIM MONDAL P. Generation of extended light-sheets for single and multi-photon fluorescence microscopy[J]. Applied Physics Letters, 2013, 103(4): 043701.
- [21] ZHAO M Y, LI B H, ZHANG H X, et al. Activatable fluorescence sensors for *in vivo* bio-detection in the second near-infrared window[J]. Chemical Science, 2021, 12(10): 3448-3459.
- [22] GOMES A J, LUNARDI C N, ROCHA F S, et al. Experimental methods in chemical engineering: fluorescence emission spectroscopy[J]. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 2019, 97(8): 2168-2175.
- [23] CUCCI C, MIGNANJ A G, DALL C, et al. A portable fluorometer for the rapid screening of M1 aflatoxin[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2007, 126(2): 467-472.
- [24] POKRZYWNICKA M, KONCKI R, TYMECKI Ł. A concept of dual optical detection using three light emitting diodes[J]. Talanta, 2010, 82(1): 422-425.
- [25] GENG X H, WANG N, GAO Y, et al. A novel HPLC flow cell integrated UV light emitting diode induced fluorescence detector as alternative for sensitive determination of aflatoxins [J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1033: 81-86.
- [26] 陈琳. 酶标分析仪计量检测的探讨与研究[J]. 计量与测试技术, 2018, 45(11): 50, 53.
- CHEN L. Discussion and research on measurement and detection of ELISA analytical instruments[J]. Metrology & Measurement Technique, 2018, 45(11): 50, 53.
- [27] 曹先海, 庞冉冉, 李盼盼, 等. 酶标仪性能验证方法建立及应用[C]. 第九届药物毒理学会论文集, 2019: 234-235.
- CAO X H, PANG R R, LI P P, et al. Establishment and application of microplate reader performance verification[C]. Proceedings of the 9th Annual Conference of Drug Toxicology, 2019: 234-235.
- [28] 郭同兵, 彭丽华, 陈燕平. 检定酶标仪的标准中性滤光片的校准方法及结果分析[J]. 中国计量, 2020(7): 82-84.
- GUO T B, PENG L H, CHEN Y P. Calibration and analysis of standard neutral filter for verification microplate reader [J]. China Metrology, 2020(7): 82-84.
- [29] 陆丰荣, 曾玉梨, 李国樑, 等. 不同酶标板与加样量对多功能酶标仪测定结果影响[J]. 中国职业医学, 2019, 46(2): 215-220.
- LU F R, ZENG Y L, LI G L, et al. Effect of different types of microplate and loading volumes on the detection results of multi-function microplate reader[J]. China Occupational Medicine, 2019, 46(2): 215-220.
- [30] 博科产品介绍 [EB/OL][2023-03-01]. <https://www.biobase.cn/ProductCenter/Products.aspx>.
- Product profile of BioBase[EB/OL][2023-03-01]. <https://www.biobase.cn/ProductCenter/Products.aspx>.



通讯作者: 何凯(1972—), 男, 博士, 教授级高级工程师。研究方向包括精密制造及自动化技术、工业机器人、金属成形技术及装备、生物制造自动化技术等。
E-mail: kai.he@siat.ac.cn



第一作者: 马翠(1983—), 女, 助理研究员。研究方向为光学检测。
E-mail: cui.ma@siat.ac.cn