

Optische Qualitätskontrolle für hoch parallelen TopSpot® Microarray Printer

Dipl.-Ing. N. Wangler¹, Prof. Dr. rer. nat. R. Zengerle^{1,2}, Dr. rer. nat. P. Koltay^{1,3}

¹ Universität Freiburg, Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK), Georges-Köhler-Allee 106, D-79110 Freiburg

² Institut für Mikro- und Informationstechnik der Hahn-Schickard-Gesellschaft (HSG-IMIT), Wilhelm-Schickard-Straße 10, D-78052 Villingen-Schwenningen

³ BioFluidix GmbH, Georges-Köhler-Allee 106, D-79110 Freiburg

Kurzfassung

Durch Integration zweier digitaler Kameras wurde eine optische Qualitätskontrolle in den hoch-parallelen Microarray Printer „TopSpot® E“ realisiert. Die Integration einer ersten 1,3 Megapixel Webcam erlaubt die Abbildung jedes gedruckten Tropfenarrays unmittelbar nach dem Drucken auf ein transparentes Substrat und realisiert damit eine kontinuierliche Prozessüberwachung. Eine hochleistungsfähige XGA CCD-Kamera ermöglicht stroboskopische Aufnahmen der fliegenden Tropfen und erlaubt somit die benutzerfreundliche Optimierung der Printparameter. Beide Kameras sind vollständig in das Gehäuse des TopSpot® E Printers integriert und ergänzen die Benutzerfreundlichkeit des bisherigen Gerätes erheblich.

1 Einleitung

Die Einführung der Microarray Technologie durch Roger Ekins et al. im Jahr 1989 [1] hat die analytischen Möglichkeiten in der Biotechnologie entscheidend ergänzt. Mit ihr wurden hochparallele Testverfahren zu DNA-, Protein- und Zellanalytik in eine Vielzahl von Labors eingeführt. Mit zunehmender Verbreitung dieser Technologie erlangen preisgünstige Produktionsmethoden für die Herstellung von Microarrays eine immer größere Bedeutung. Der kommerziell erhältliche Microarray Printer TopSpot® E von BioFluidix (siehe Bild 1) basiert auf der gleichnamigen TopSpot® Technologie [2]. Sie nutzt einen pneumatischen Druckimpuls zur Erzeugung eines 24er bzw. 96er Tropfenarrays, welches in einem Raster von 500 µm im non-contact Modus üblicherweise auf Glassubstrate gedruckt wird.

Der pneumatische Druckpuls wird mittels eines Kolbenverdrängers innerhalb eines in Silizium-/Glastechnologie gefertigten Druckkopfs generiert.

Die im Druckkopf enthaltenen Flüssigkeiten werden gleichzeitig durch das Düsenarray (siehe Bild 2) als freifliegende Tropfen ausgestoßen [3]. Die Qualität des Tropfenarrays (Volumen: 1 nl; Rastermaß: 500 µm) hängt stark von den Ansteuerparametern des Piezoaktors ab, weshalb eine Optimierung dieser Parameter auf die jeweiligen Druckmedien erforderlich ist. Zu diesem Zweck wurde eine optische Qualitätskontrolle entwickelt. Sie besteht aus zwei digitalen Kameras. Die eine dient zur stroboskopischen Detektion der Tropfen in der Flugphase während die andere ein Foto des gedruckten Microarrays vor dem Eintrocknen der Tropfen liefert. Beide Kameras sind in das Gehäuse des TopSpot® E Printers integriert und erweitern die Benutzerfreundlichkeit des bestehenden Systems.



Bild 1 TopSpot® E-Vision Printer mit ausgefahrenem Sildehalter

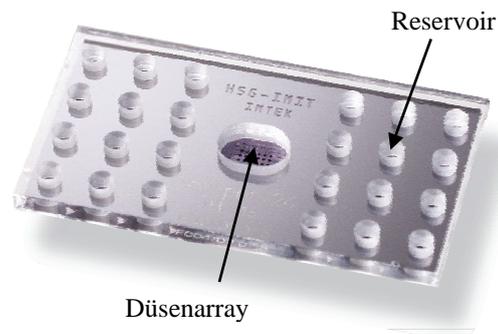


Bild 2 TopSpot® Druckkopf mit 24 Kanälen

2 Optische Qualitätskontrolle

Die kontinuierliche Prozesskontrolle wird durch eine visuelle Überwachung jedes gedruckten Arrays realisiert. Diese Kontrolle wird im Folgenden als „Spot Check“ bezeichnet. Da bei der Produktion von Microarrays unter anderem salzhaltige Pufferlösungen (z.B. PBS) verwendet werden, besteht die Gefahr, dass durch Kristallisation mit der Zeit einzelne Mikrokanäle des Druckkopfes verstopfen, was zu unregelmäßigen oder fehlerhaften Arrays führt. Um in diesem Falle frühzeitig eingreifen zu können ist eine Kontrolle der gedruckten Arrays unabdingbar.

Die zweite optische Kontrollfunktion, „Drop Check“ genannt, erlaubt bei Bedarf die stroboskopische Aufnahme der dispensierten Tropfen im Flug. Die damit erzeugten Bilder geben wertvolle Hinweise zur Einstellung der korrekten Antriebsparameter zur Optimierung des Druckpulses im Druckkopf.

2.1 Realisierung des Spot Check

Das Anfahren einer Kontrollposition nach jedem Druckvorgang ist aus verschiedenen Gründen nicht praktikabel. Deshalb wurde zur Realisierung des Spot Check zunächst ein visueller Zugang von unten durch das Slide hindurch gewählt. Hierfür mußte zunächst ein neuer Slidehalter entwickelt werden.

2.1.1 Neuentwicklung Slidehalter

Ein XY-Achssystem im TopSpot® E Microarrayer ermöglicht die exakte Positionierung der handelsüblichen Slides unterhalb des Druckkopfes und erlaubt das Bedrucken der kompletten Slidefläche. Da der Druckkopf in einem Abstand von nur 500 µm über dem Slide positioniert ist und ein visueller Zugang

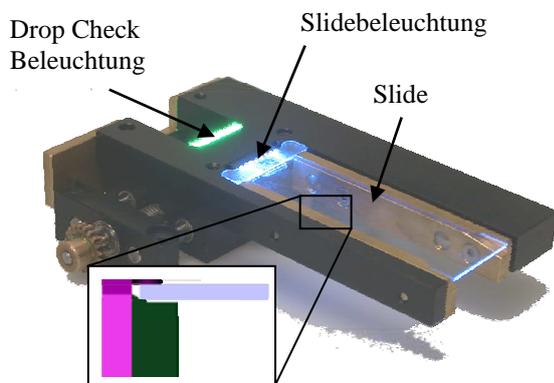


Bild 3 Neuer Slidehalter mit visuellem Zugang von unten und integrierter Slide- und Drop Check Beleuchtung

von oben deshalb erheblich erschwert ist, wurde ein Slidehalter realisiert, der die Aufnahme der gedruckten Tropfen von der Rückseite durch das transparente Slide hindurch erlaubt.

Durch eine Klemmung des Slides von der Seite und geschickt abgeschrägten Klemmböcken wird das Slide unabhängig von Dicke oder Breite in einem Abstand von exakt 500 µm zum Druckkopf positioniert (siehe Bild 3). Die Illumination der Tropfen auf der Slideoberfläche ist ebenfalls im Slidehalter integriert. Durch das Einkoppeln von Licht in die Stirnseite des Slides fungiert dieses als Lichtwellenleiter. Von der bedruckten Seite bzw. der gegenüber liegenden Seite leuchtet das Slide nur sehr schwach. Befinden sich nun Tropfen auf der Slideoberfläche, so wird aufgrund der ähnlichen Brechungsindizes von Slide (z.B. Glas, PMMA, $n \approx 1,5$) und Flüssigkeit (z.B. Wasser, $n = 1,33$; DMSO, $n = 1,48$) Licht in den Tropfen gebrochen. Durch Brechung und Mehrfachreflexionen an der Tropfenoberfläche beginnen diese zu leuchten. So ist eine kontrastreiche Abbildung der Arrays im dunklen Gerät und damit eine kontinuierliche Überwachung der Produktion möglich.

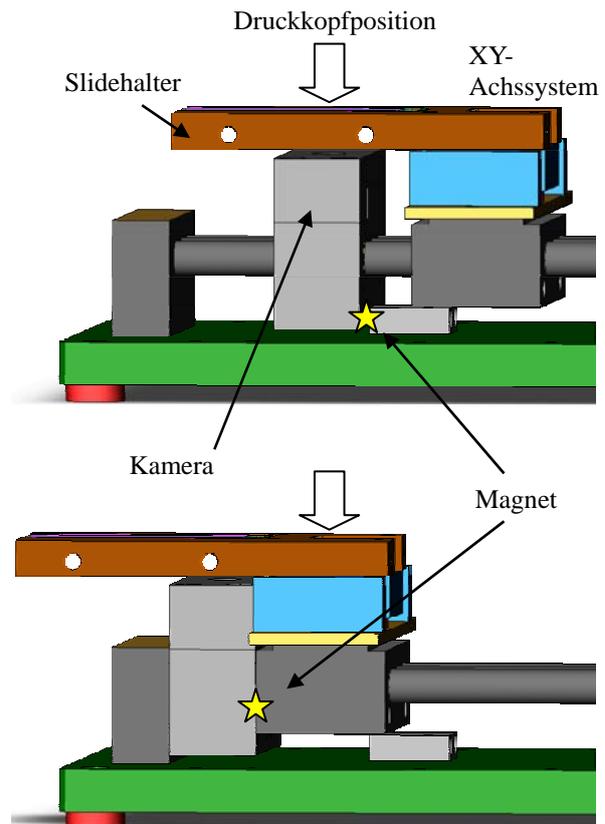


Bild 4 Funktionsweise des Spot Check Kameraschlittens

2.1.2 Spot Check

Durch den oben beschriebenen Slidehalters ist somit ein visueller Zugang von der Unterseite des Slides realisiert. Um weiterhin zu gewährleisten, dass die gesamte Slidefläche bedruckt, bzw. der Slidehalter zum Be- und Entladen aus dem Gerät herausgefahren werden kann, muss die Kamera beweglich integriert werden. Hierzu wurde eine handelsübliche Webcam auf einem mobilen Schlitten integriert, der sich bei Aufnahme von Bildern immer direkt unterhalb und gegenüber des Düsenarrays positioniert ist. Wird die Kamera nicht benötigt, kann sie von dem Schlitten der X-Achse, welche den Slidehalter bewegt mitgeführt werden und behindert den Transport der Slides nicht. Der Schlitten, welcher mittels Trockengleitlager (DUBuchse, Glacier) beliebig auf der X-Achse bewegt werden kann wird durch Magnetkraft an den Schlitten der X-Achse, bzw. am Anschlag unterhalb des Druckkopfes festgehalten (siehe Bild 4). So wird der Kameraschlitten vom Schlitten der X-Achse nach vorne geschoben, wenn der Bereich unterhalb des Druckkopfes überfahren wird. Die Magnete ermöglichen die exakte Positionierung unterhalb des Druckkopfes und das Mitnehmen des Kameraschlittens in umgekehrter Richtung.

Als Kamera dient eine modifizierte 1,3 Megapixel Webcam von Logitech® (QuickCam® für Notebooks Pro). Um die gedruckten Arrays aus dem gegebenen Abstand während des Druckvorgangs abbilden zu können, mußte der Fokus der Kamera modifiziert werden.

2.2 Drop Check

Sowohl die Viskosität als auch die Oberflächenenergie der zu druckenden Flüssigkeiten haben direkten Einfluss auf die Tropfengeneration des TopSpot® Druckkopfes [3]. Die Tropfengeschwindigkeiten der dispensierten Arrays beispielsweise variieren bei verschiedenen Substanzen. Sollen nun unbekannte Flüssigkeiten gedruckt werden, so ist es essentiell die idealen Druckparameter (Piezohub, Aktuationsgeschwindigkeit) zu evaluieren. Ein wichtiges Aussagekriterium für die Reproduzierbarkeit des Druckvorgangs ist die Form und Fluggeschwindigkeit der Tropfen. Ist diese bei allen Tropfen identisch, so ist der Druckvorgang unter Kontrolle [4].

Aus diesem Grund ist das stroboskopische Abbilden der Tropfen während der Flugphase wünschenswert. Hierfür wird wie zuvor ein beweglicher Kameraschlitten eingesetzt, auf welchen die Kamera für das Fotografieren der Tropfen im Flug montiert ist. Bei Bedarf kann diese Drop Check Kamera vom Schlitten der X-Achse abgeholt werden, wobei eine mechanische Verriegelung (ähnlich einer Türfalle) gelöst wird. Der Kameraschlitten wird mittels Magneten von dem

Schlitten der X-Achse gezogen und an einem Anschlag in der Bodenplatte im korrekten fokalen Abstand fixiert. Die dispensierten Flüssigkeiten für die Drop Check Funktion werden in einem speziellen Auffangbehälter im hinteren Bereich des Slidehalters aufgefangen. Um ein gutes Kontrastverhältnis zwischen fliegender Tropfen und Umgebung zu realisieren werden die Tropfen im Gegenlicht abgebildet. Ein LED-Array und ein lichtleitendes PMMA-Stück sorgen für eine homogen leuchtende Fläche hinter den Tropfen (vgl. Bild 3). Als Kamera für den Drop Check wird eine industrielle CCD-Kamera mit einer Auflösung von 1024 x 768 Pixel (XGA) verwendet. Die UI-2230 von IDS verfügt über die Möglichkeit mittels eines externen Triggers Aufnahmen mit einer Verschlusszeit von 66 µs zu realisieren. Als optische Einheit wird hier ein handelsübliches C-Mount Objektiv von Pentax (C2514-M(KP)) mit 10 mm Distanzhülse verwendet.

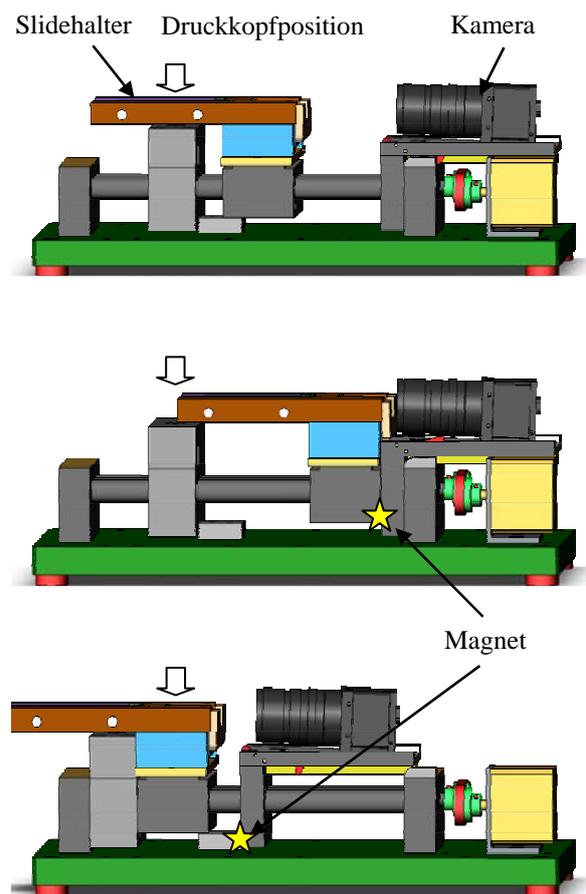


Bild 5 Funktionsweise des Drop Check Kameraschlittens

3 Experimentelle Ergebnisse

3.1 Auflösung der Spot Check Kamera

Mit oben genanntem Aufbau der Spot Check Funktion läßt sich eine Fläche von 1 mm² mit 38 x 38 Pixel abbilden. Ein Pixel entspricht so einer Distanz von 26 µm. Aufgrund der Tatsache, dass der CMOS-Sensor der Logitech® QuickCam® kein binäres Signal ausgibt (z.B. ein 8-bit Graustufensignal beinhaltet 256 verschiedene Zustände) können Objekte von einer Größe deutlich unter 20 µm detektiert werden. Dies ermöglicht eine ausreichende Prozessüberwachung der gedruckten Arrays während der Microarray Produktion. Ein einzelner Arraytropfen besitzt auf dem Slide einen Durchmesser von rund 200 µm und besteht somit im Durchmesser aus ca. 8 Pixeln. Fehlende Tropfen im Array, eventuell auftretende Satteliten von mehr als 1/100 des Tropfenvolumens und Positionsabweichungen von 20µm können garantiert detektiert werden. Somit sorgt die Spot Check Funktion für eine höhere Produktionssicherheit, da auftretende Fehler frühzeitig erkannt werden. Bild 6 zeigt ein mit der TopSpot® E-Vision Spot Check Kamera aufgenommenes Array.

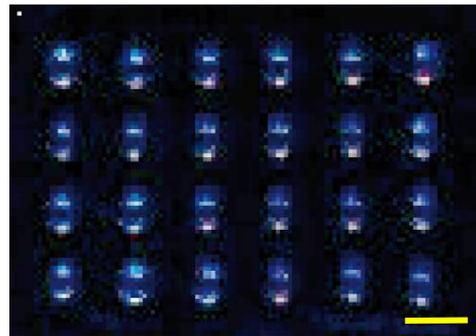


Bild 6 Arrayaufnahme Spot Check; Skala entspricht 500 µm

3.2 Auflösung der Drop Check Kamera

Die UI-2230 von IDS ist mit dem Pentaxobjektiv C2514-M(KP) (+10 mm Distanzhülse) in der Lage Objekte in einem Abstand zwischen 38 mm und 50 mm scharf abzubilden. Ein einzelner Tropfen im Flug (Durchmesser ~ 100 µm) wird mit mehr als 50 Pixeln wiedergegeben. Mit Hilfe der Drop Check Funktion können die Ansteuerparameter des Piezoaktuators perfekt angepasst werden. Die Tropfen eines solchen gedruckten Arrays haben alle die selbe Geschwindigkeit, was sich darin zeigt, dass die Tropfen in einer Ebene fliegen (siehe Bild 7).

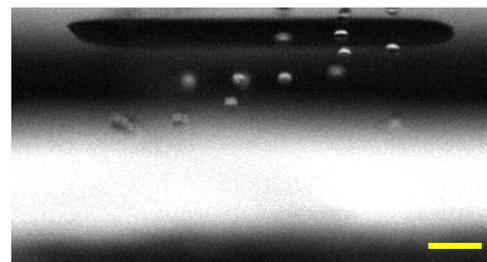
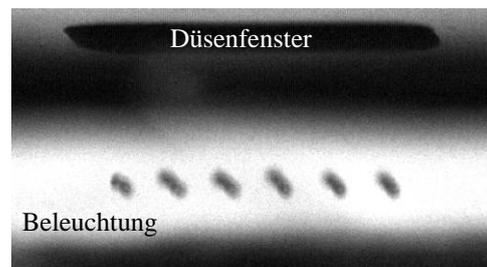


Bild 7 Arrayaufnahme Drop Check mit idealen Printparametern (oben) mit falschen Printparametern (unten); Skala entspricht 500 µm

4 Fazit

Durch die Integration einer optischen Qualitätskontrolle im hoch parallelen Microarray Printer TopSpot® E von BioFluidix eröffnen sich neue Möglichkeiten der High-Quality Microarray Produktion im kleinen Maßstab für den Forschungs- und Laborbedarf. Zum einen erlaubt die integrierte 1,3 Megapixel Kamera eine kontinuierliche Produktionsüberwachung, wodurch ein hoher Qualitätsstandard gesichert werden kann. Zum anderen wird durch die stroboskopische Kontrolleinheit das Ermitteln der optimalen Printparameter zum präzisen Drucken unbekannter Flüssigkeiten erleichtert.

5 Literatur

- [1] R. Ekins, F. Chu, E. Biggart; "Development of Microspot Multi-Analyte Radiometric Immunoassay Using Dual Fluorescent-Labelled Antibodies"; *Analytica Chimica Acta*, Vol. 227, Nr. 1, Dez. 1989
- [2] BioFluidix GmbH; <http://www.biofluidix.com>, July 07
- [3] O. Gutmann et al.; "Impact of medium properties on droplet release in a highly parallel nanoliter dispenser"; *Sensors and Actuators*, Vol. 116, Nr. 2, Okt. 2004
- [4] O. Gutmann et al.; "Fast selective surface modification of microfluidic printheads for improvement of droplet ejection"; μ TAS Konferenz 2005, Okt. 2005