ASKION GmbH
Gewerbepark Keplerstraße 17-19
D-07549 Gera

Abschlussbericht Förderprojekt RUBIN

Teilvorhaben der ASKION GmbH Gera:

„NeuroMiR VP2: Entwicklung einer NIR Fluoreszenz- und POC Testplattform“

Förderrichtlinie:	RUBIN – Regionale unternehmerische Bündnisse für Innovation
Förderkennzeichen:	03RU1U052B
Fördergegenstand:	TP 2.2 Entwicklung der Geräteplattform für die NIR-Fluoreszenzmikroskopie für miRNA-Test
Projektbeschreibung:	Es sollen Prototypen einer Fluoreszenzmikroskop Plattform entwickelt und aufgebaut werden, die die für miRNA-Tests notwendige Nachweisgrenze von 10 pg/ml erreichen und das angestrebte NIR-Multilabeling zulassen. Um die Nachteile der UV/VIS-Fluoreszenz wie Autofluoreszenz und Crosstalk von VIS-Markern, die letztendlich die Nachweisgrenze limitieren zu beseitigen, wird ein Anregungs- und Detektionskanal für den NIR-Spektralbereich konzipiert.
Laufzeit:	01.02.2022 – 31.01.2025
Erstellt:	30.07.2025

Inhalt

1. Projektziel ... 3
2. Ausgangssituation und geplanter Ablauf ... 3
3. Prinzip Fluoreszenzmikroskop ... 5
4. Labormuster ... 6
4.1. NIR-Anregungseinheit ... 6
4.2. Optische Filter ... 7
4.3. NIR-Kamera ... 8
4.4. Ergebnisse ... 8
5. Gerätekonzept, Aufbau und Entwicklung von 3 Prototypen ... 9
5.1. Optik ... 10
5.2. xy-Positionierung und Fokussierung ... 11
5.3. Objektiv- und Filterwechsler ... 13
5.4. Elektronik, Systemsteuerung und Software ... 14
6. Inbetriebnahme, Test und Übergabe der Prototypen ... 17
7. Zusammenfassung und Ausblick ... 18
7.1. Zusammenfassung ... 18
7.2. Erweiterung zu einem System mit hohem Probendurchsatz ... 19
7.3. Ausblick ... 20

1. Projektziel

Im Rahmen des hier beschriebenen gerätetechnischen Teilprojektes sollen Prototypen einer Fluoreszenzmikroskop-Plattform entwickelt und aufgebaut werden, die die für miRNA-Tests notwendige Nachweisgrenze von 10 pg/ml erreichen und ein angestrebtes NIR-Multilabeling zulassen. Um die Nachteile der UV/VIS-Fluoreszenz wie Autofluoreszenz und Crosstalk von VIS-Markern, die letztendlich die Nachweisgrenze limitieren zu beseitigen, wird der Anregungs- und Detektionskanal zusätzlich um einen Kanal im nahen infraroten (NIR) Spektralbereich erweitert.

Als Anregungsquellen waren ursprünglich VCSEL (vertical-cavity surface-emitting laser) im Wellenlängenbereich von 780nm und 850nm vorgesehen. Derartige VCSEL werden in großen Stückzahlen für Anwendungen in Consumer Electronics serienmäßig zu sehr kompetitiven Kosten hergestellt. Da VCSEL eine sehr gut definierte und enge Abstrahlcharakteristik haben, kann der gesamte optische Aufbau mittels Mikro-Optik und Mikro-Packaging miniaturisiert werden. Zudem erlaubt die sehr niedrige Leistungsaufnahme von ca. 2 - 3 mW pro VCSEL (im Vergleich zu 40 mW bei LEDs) eine äußerst energieeffiziente Messung.

Diese neuartige Strahlungsquelle soll im Projekt mit einer möglichst preisgünstigen Kamera, die auch noch im NIR empfindlich genug ist, kombiniert werden. Der Anregungs- und Detektionspfad soll möglichst modular konzipiert werden, um jeweils anwendungs- bzw. kundenspezifisch eine optimale Gerätekonfiguration realisieren zu können.

Um die Anwendung für POC (point of care) Tests zu ermöglichen, müssen die Prototypen als kompakte Tischgeräte konzipiert werden und eine einfache Bedienung und automatisierbare Routinen zulassen. Eine geeignete anwendungsspezifische Software zur Gerätesteuerung und ggf. Auswertung ist zu implementieren. Weiterhin muss das Gerätekonzept eine zukünftige Integration in Hochdurchsatz-Diagnoseplattformen zulassen. Die neue NIR-Fluoreszenzplattform wird auf den Ergebnissen der Entwicklung einer modularen, kompakten und automatisierten Geräteplattform für Fluoreszenzmikroskope für die in-vitro Diagnostik aufbauen.

2. Ausgangssituation und geplanter Ablauf

Basierend auf langjährigen Erfahrungen in der Entwicklung optischer Systeme und Geräte, aus einer Marktanalyse zu möglichen Kunden, Anwendungsgebieten und Konkurrenzprodukten sowie aus Diskussionen mit potentiellen Kunden hat Askion 2019 mit der Entwicklung einer automatisierten Fluoreszenz-Mikroskopie-Plattform begonnen.

Die damalige Marktanalyse ergab, dass es einen Bedarf sowohl

- an einem möglichst preisgünstigen Fluoreszenzmikroskops mit 3 Fluoreszenz-Kanälen, einem fest eingebauten Objektiv mit vorab auswählbarer Vergrößerung und mit begrenzter Anzahl und Flexibilität der Probenformate als „*low cost*“ Variante als auch
- an einem „erweiterten und größerem“ Gerät mit bis zu mit 4 Fluoreszenz-Kanälen, zusätzlichem Filter- und Objektivwechsler und einer größeren Flexibilität bzgl. der Probenanzahl und -formaten als „*advanced performance*” Variante gibt.

Beide Systeme sollen mit automatisierten Abläufen komplette Proben (hauptsächlich auf 25mm x 75mm großen Mikroskopie-Objektträgern) scannen und sind deshalb eher für Routine-Untersuche als für wissenschaftliche Anwendungen geeignet (dieser Bereich wird durch die komplexen Systeme der bekannten großen Hersteller wie Zeiss, Leica, Olympus u.a. bereits abgedeckt).

Um den Entwicklungsaufwand und die Serienpreise gering zu halten, wurden beide Systeme als reine Fluoreszenz-Mikroskope für den VIS-Bereich konzipiert.

Die Entwicklung dieser Fluoreszenz-Mikroskopie-Plattform wurde dabei teilweise von der TAB (Thüringer Aufbau Bank) im Zeitraum von 2020 bis 2022 gefördert.

Bis 2022 konnten erste seriennahe Prototypen des „*low cost*“ Gerätes erfolgreich aufgebaut werden, während die ersten Labormuster des „*advanced performance*” Gerätes die geforderten technischen Spezifikationen insbesondere hinsichtlich des Positioniersystems für einen automatischen Scan leider nicht erfüllt haben.

Im hier beschriebenen NeuroMir-Projekt war Askion für die gerätetechnischen Aspekte der NIR-Fluoreszenz-Mikroskopie verantwortlich; anwendungsseitige medizinische und biochemische Aspekte lagen in der Verantwortung der Projektpartner. Die wichtigste Aufgabe für Askion im Rahmen des NeuroMir-Verbundes war dabei die Erweiterung des Detektionsbereiches der Fluoreszenz-Mikroskope auf das nahe Infrarot (NIR). Basis dazu war der aktuelle Stand der oben beschriebenen Fluoreszenz-Mikroskopie-Plattform. Ziel war hier zusätzlich eine Optimierung der Mechanik, Optik, Elektronik und Systemsteuerung des „*advanced performance*” Gerätes für einen sichereren, automatisierten Betrieb (auch im NIR) und einen höheren Durchsatz an Proben.

Sämtliche gerätetechnischen Anforderungen wurden laufend jeweils eng mit den Projektpartnern diskutiert und abgestimmt sowie die Ergebnisse gemeinsam bewertet.

Die eigentliche Entwicklung der Prototypen eines NIR-Fluoreszenz-Mikroskops erfolgt dabei in 2 Stufen:

Um möglichst schnell zu belastbaren Ergebnissen zu kommen, wird zuerst ein bereits existierendes „*low cost*“ Gerät von der standardmäßigen Detektion im VIS zu einem einkanaligen System für NIR umgebaut, damit die prinzipielle Machbarkeit sicher experimentell bewertet werden kann. In der zweiten Stufe wird anschließend ein mehrkanaliges Gerät zur Detektion im VIS und NIR basierend auf den Erfahrungen mit dem Labormuster des „*advanced performance*“ Systems entwickelt. Neben der Integration eines zusätzlichen NIR-Kanals muss hier außerdem die Mechanik zum Positionieren und Fokussieren, die Elektronik sowie die Firm- und Software neu entwickelt und iterativ optimiert werden.

Final werden 3 Prototypen aufgebaut; 2 davon zur Übergabe an Projektpartner und ein Gerät als technische Referenz zum Verbleib bei Askion.

3. Prinzip Fluoreszenzmikroskop

Das optische System eines Fluoreszenz-Mikroskops *(siehe Abb. 3-1)* besteht aus einem Anregungspfad mit Lichtquellen (hier z.B. LED) und einem Detektionspfad mit einer monochromatischen Kamera. Beide Pfade werden mittels eines dichroitischen Spiegels als Strahlteiler zusammengefasst.

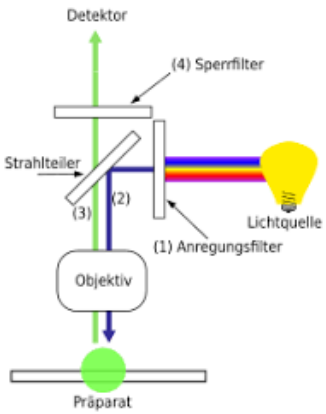

Abb. 3-1 Grundprinzip Optik für ein Fluoreszenzmikroskop (Quelle: wikipedia.de)

In mehrkanaligen Mikroskopen werden die einzelnen Fluoreszenz-Kanäle mit optischen (Multi-) Bandpass-Filtern für die Anregung und die Detektion voneinander getrennt.

Mittels einer motorischen Bewegung in x- und y-Richtung werden die Proben in einer Reihe von Einzelbildern automatisch gescannt. Fokussiert wird ebenfalls durch eine motorische Bewegung des Objektivs in z-Richtung.

Die von Askion entwickelten Fluoreszenz-Mikroskope detektieren Fluorophore im visuellen (VIS) und nahem UV (NUV) Bereich; standardmäßig sind die Systeme dabei für die Fluorophore DAPI, FITC und Cy5 konfiguriert. In der Abbildung unten sind jeweils die Anregungs- und Detektions-Wellenlängen-Bereiche der einzelnen Fluorophore dargestellt; die 3 linken Bereiche zwischen 350nm und 700nm zeigen DAPI (rosa), FITC (braun) und Cy5 (blau).

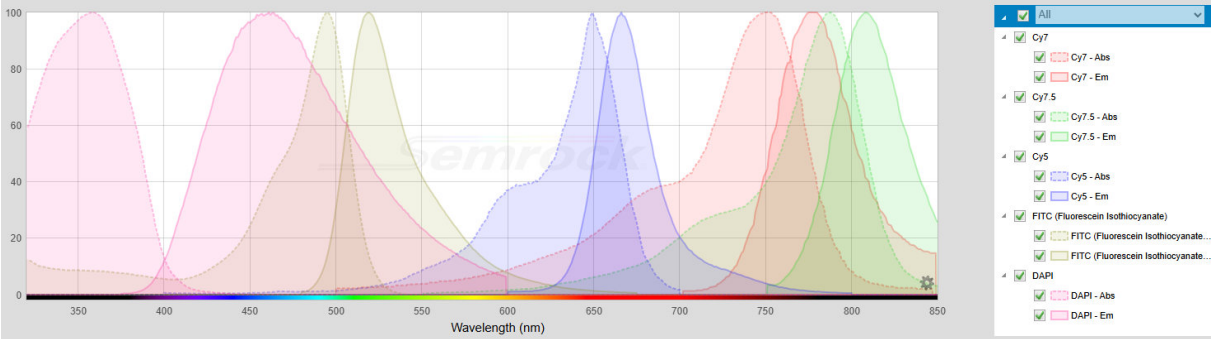

Abb. 3-2 Absorptions- und Emissionssprektren der Fluophore DAPI, FITC, Cy5, Cy7 und Cy7.5 (von links)

In initialen Diskussionen mit den Projektpartnern haben wir gemeinsam entschieden, uns im hier beschriebenen Projekt auf die NIR-Detektion von Cy7 und Cy7.5 (die Bereiche rechts im Spektrum von 700nm bis 850nm) zu konzentrieren. Da sind etablierte, kommerziell erhältliche Fluorophore, die sich nach Aussagen der Projektpartner gut zum Labeling biochemischer Proben eignen.

4. Labormuster

Um möglichst schnell und mit überschaubarem Aufwand nachzuweisen, dass auch Fluorophore im NIR detektiert werden können, haben wir uns entschlossen, im ersten Schritt ein nur einkanaliges NIR-Fluoreszenz-Mikroskop auf Basis des existierenden „*low cost*“ Gerätes aufzubauen und mit realen Proben zu testen. Dazu waren folgende Anpassungen nötig:

- Integration einer für Cy7 bzw. Cy7.5 geeigneten Anregungs-Einheit
- Integration von für Cy7 bzw. Cy7.5 geeigneten optischen Filtern
- Einsatz einer auch im NIR empfindlichen monochromatischen Kamera

Der mechanische Grundaufbau einschließlich der Positionier- und Fokussiereinheit, die Elektronik und Software zur Ansteuerung und die Bedienoberfläche wurden weitestgehend übernommen und in Teilen angepasst. Um hier schnell zu ersten Ergebnissen zu kommen, wurde bewusst auf eine in den späteren Prototypen zwingend notwendige Mehrkanaligkeit für Messungen im VIS und im NIR verzichtet.

4.1. NIR-Anregungseinheit

Die Anregung der Fluoreszenz in den VIS-Kanälen der von Askion entwickelten Fluoreszenz-Mikroskope wurde erfolgreich mit LEDs in den entsprechenden Wellenlängenbereichen realisiert. Im Antrag für das hier beschriebene Projekt sind wir vom Einsatz so genannter VCSEL (vertical-cavity surface-emitting laser, also oberflächenemittierende Laser) im NIR-Wellenlängenbereich ausgegangen. Wie im Antrag bereits dargestellt, sind solche Bauelemente für bestimmte Anwendungen (z.B. in der Telekommunikation) und bestimmte Wellenlängen (z.B. 780 … 785nm) in hohen Stückzahlen zu günstigen Preisen entweder direkt vom Hersteller oder über die bekannten Distributoren (z.B. Thorlabs) im Standart-TO-Gehäuse verfügbar:

Abb. 4-1 Beispiel für kommerziell verfügbare kostengünstige VCSEL (hier screenshot aus Thorlabs-Katalog; Juli 2025)

VCSEL mit einer Abstrahlung um 780nm passen gut zur Anregung von Cy7.5; entsprechende VCSEL für Wellenlängen um 750nm zur Anregung von Cy7 (kommerziell verfügbar sind z.B. 730nm oder 760nm) sind aber sehr deutlich teurer.

Da die Fluoreszenz im Gerät jedoch final sowohl im VIS als auch im NIR angeregt werden muss und der VIS-Bereich hier bereits durch kommerziell verfügbare LED in feiner Abstufung der Wellenlängen abgedeckt werden kann, haben wir uns entschlossen, die Fluoreszenz auch im NIR mittels LED (hier z.B. als High Power LED der Firma Lumixtar) anzuregen. Das hat zusätzlich den Vorteil, dass sowohl die Ansteuer-Elektronik als auch die Optik (Kollimator) und die Opto-Mechanik weitestgehend wieder verwendet werden konnte.

Im Gegensatz zu VCSEL mit ihrer sehr schmalbandigen Abstrahlcharakteristik, muss das LED-Licht aber optisch gefiltert werden, was aber mittels (Multi-) Bandpass-Filtern sehr effizient und einfach möglich ist.

4.2. Optische Filter

Für das einkanalige Labormuster wurden die Wellenlängenbereiche für die Anregung und die Detektion von Cy7 und Cy7.5 mit jeweils zwei einfachen und schnell verfügbaren optischen Bandpass-Filtern (hier für Cy7.5 dargestellt) und einem Dichroiten (ein wellenlängenabhängiger Strahlteiler) voneinander getrennt:

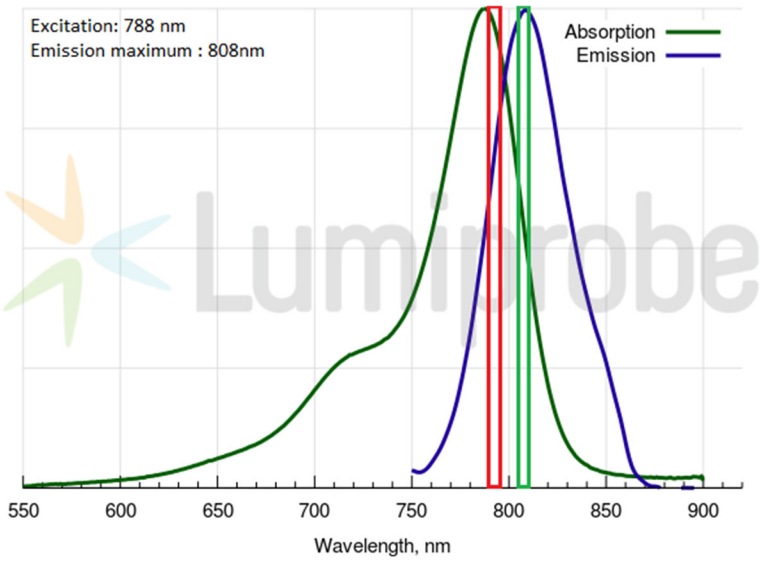

Abb. 4-2 einfache optische Filter für erste Versuche zur Detektion von Cy7.5 (Herstellerangaben)

Auch wenn der jeweilige Durchlassbereich dieser Bandpassfilter sehr schmal ist, konnte die prinzipielle Machbarkeit der Detektion im NIR sicher nachgewiesen werden.

4.3. NIR-Kamera

Kameras für den VIS-Bereich verfügen üblicherweise über einen IR-Sperrfilter vor dem Kamerachip, um durch IR-Strahlung verursachte (hauptsächlich thermische) Artefakte in den aufgenommenen Bildern zu vermeiden. Für eine Detektion im NIR ist das natürlich kontraproduktiv.

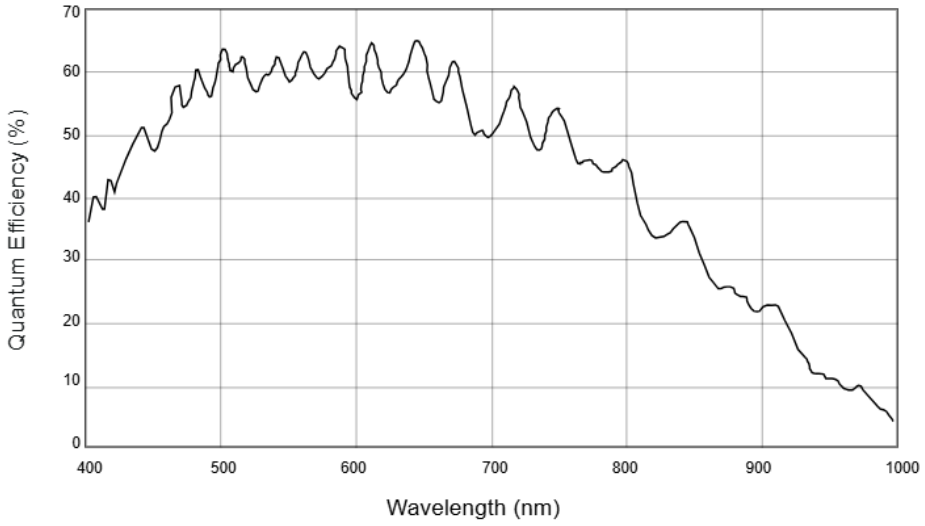

Abb. 4-3 wellenlängenabhängige Empfindlichkeit der verbauten Basler-Kamera zur Detektion im VIS und NIR

Wir haben umfangreich nach geeigneten Kameras recherchiert, die sowohl im VIS als auch im NIR empfindlich genug sind. Unter Abwägung der technischen Parameter und des Preises haben wir uns final für die Kamera Basler ace acA2040-90umNIR entschieden. Ihre wichtigsten Parameter sind:

- 11.26 mm × 11.26 mm großem CMOS-Sensor
- 2048 × 2048 Pixel
- vielfältigen integrierten Software-Features
- ausreichender Empfindlichkeit auch im NIR-Bereich (siehe Abb. 4-3)

Für die ersten Versuche wurde auf bereits vorhandene VIS-Mikroskop-Objektive mit einer ausreichenden Transmission auch im NIR zurückgegriffen. Weitere im optischen Pfad der Anregung und der Detektion der Fluoreszenz verbaute Linsen sind jeweils mit einer Antireflex-Beschichtung für VIS und NIR versehen.

4.4. Ergebnisse

Nach Auswahl und Beschaffung der o.g. notwendigen Komponenten wurde ein Labormuster aufgebaut, in Betrieb genommen und im ersten Schritt gemeinsam mit Kollegen der BTU in Gera sowohl mit Cy7- als auch (nach Wechsel der LED und der Filter) mit Cy7.5-Proben erfolgreich getestet. Damit eröffnet für die Projektpartner aus der Biochemie die Möglichkeit, ein geeignetes Fluorophor für das Labeling nicht nach gerätetechnischen, sondern nach biochemischen und kommerziellen Kriterien auszuwählen.

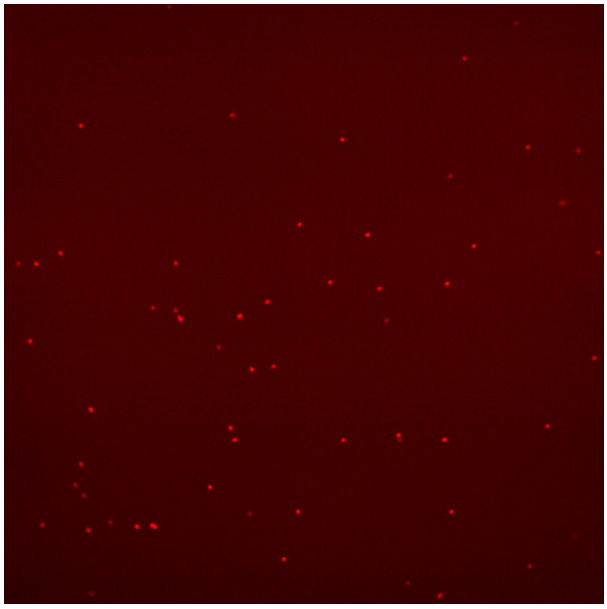

Abb. 4-4 Beispiel für die Detektion von mit Cy7 markierter Beads mit dem ersten Labormuster

Die Sensitivität, die Schärfe der Abbildung und die räumliche Auflösung wurden gemeinsam mit den Kollegen der BTU als in dieser ersten Stufe (also dem Labormuster) ausreichend eingeschätzt. Damit konnte basierend auf diesem einkanaligem Labormuster die Entwicklung der zur Detektion sowohl im VIS als auch im NIR geeigneten Prototypen ohne Änderung des messtechnischen Grundprinzips gestartet werden. Final wurde das Labormuster für weitere Untersuchungen an die Kollegen der BTU übergeben.

5. Gerätekonzept, Aufbau und Entwicklung von 3 Prototypen

Nachdem in der ersten Stufe mit dem einkanaligem Labormuster die Detektion von Fluorophoren (hier Cy7 und Cy7.5) im NIR erfolgreich demonstriert werden konnte, wurden im nächsten Schritt gemeinsam mit den Projektpartnern die Anforderungen an das im Rahmen des Projektes zu entwickelnde Gerät zur automatisierten Detektion von Fluorophoren sowohl im VIS als auch im NIR diskutiert, gewichtet und in einem Pflichtenheft zusammengefasst. Die wichtigsten Änderungen im Vergleich zum im Absatz 4 beschriebenen Labormuster sind dabei:

- Konfiguration als Mehrkanal-System zur Detektion von DAPI, FITC (beide im VIS) und Cy7 (im NIR)
- Realisierung als inverses Mikroskop, um auch well plates „von unten“ detektieren zu können
- komplette Überarbeitung bzw. Neukonstruktion der Positionier- und Fokussiereinheiten zur Gewährleistung einer ausreichenden Genauigkeit beim Positionieren und Fokussieren der Proben
- Probenaufnahme für bis zu 5 jeweils 25mm x 75mm großen slides oder einer well plate
- Überarbeitung und Optimierung der optischen Pfade für die Anregung und die Detektion
- Objektivwechsler für 10x, 20x und 40x Mikroskop-Objektive
- 2fach Filterwechsler, um entweder mit Multibandpass- oder Einzelfiltern arbeiten zu können

Die einzelnen Entwicklungen und Optimierungen werden im Folgenden detailliert beschrieben.

5.1. Optik

Das optische System entspricht dem in Abb. 3-1 dargestellten Grundprinzip. Das Licht der Anregungs-LED jedes einzelnen Fluoreszenz-Kanals wird mit einer Linse kollimiert und die einzelnen Fluoreszenz-Kanäle mittels jeweils mittels eines einfaches Dichroiten zusammengefasst. Durch Ein- und Ausschalten der einzelnen LED kann dann sehr schnell zwischen den Kanälen umgeschaltet werden. Das gesamte optische System zur Fluoreszenzanregung wurde im Optik-Programm Zemax simuliert und damit die einzelnen Komponenten und deren Abstände optimiert:

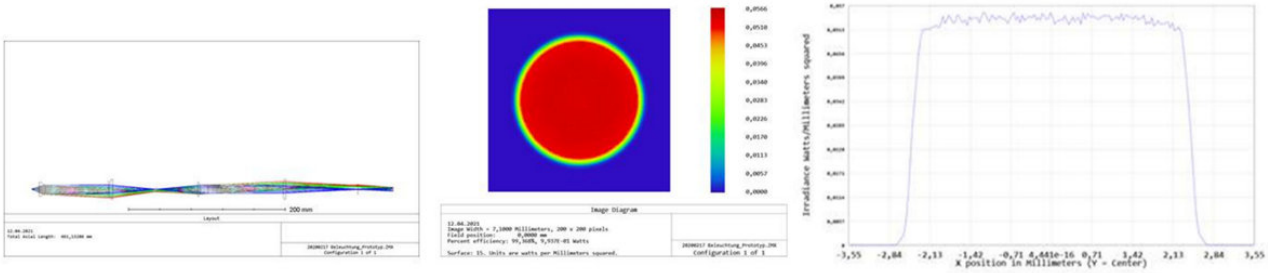

Abb. 5-1 Optimierung der Anregungsoptik Fluoreszenz-Mikroskop (Zemax-screenshot)

Es konnte nachgewiesen werden, dass das im Arbeitspaket 3 entworfene und realisierte optische System die gestellten Anforderungen gut erfüllt und nicht grundsätzlich überarbeitet werden muss. Aus kommerzieller Sicht wurde allerdings die Olympus-Tubuslinse durch eine deutlich kosten-günstigere selbst entwickelte Linsenkombination ersetzt.

Die zur Anregung der Fluoreszenz verbauten LED wurden für die 3 Kanäle DAPI, FITC und Cy7 angepasst, die LED-Platinen selbst inklusive einer optimierten Elektronik zur Ansteuerung von der Firma OUT bezogen.

Der neu entwickelte Objektivwechsler wurde mit 3 Mikroskop-Objektiven mit 10x, 20x und 40x Vergrößerung bestückt. Da aufgrund des prinzipiellen Aufbaus als inverses Mikroskop „von unten durch“ die ca. 1mm dicken Slides (bzw. durch den Boden der Well Plate) detektiert wird, müssen entsprechend korrigierte Mikroskop-Objektive eingesetzt werden. Nach umfangreichen technischen und Preis-Recherchen haben wir uns hier für die UPLFLN- bzw. LUCPLFLN-Serie von Olympus entschieden.

Um das Gerät für spätere Änderungen in der Konfiguration möglichst flexibel zu halten, wurde ein mechanischer Filterwechsler für 2 Filtersätze integriert. Ein Filtersatz ist dabei für die Detektion von DAPI und VIS im VIS vorgesehen, der zweite für die Detektion von Cy7 oder Cy7.5 optimiert. Dadurch, dass damit der Cy7- bzw. Cy7.5-Kanal unabhängig vom VIS-Bereich ist, kann ein hohes Signal und ein geringer cross talk zwischen den Kanälen gewährleistet werden.

Alternativ wurde erfolgreich eine Multi-Bandpass-Konfiguration recherchiert, beschafft, eingebaut und erfolgreich getestet, die auf einem DAPI/FITC/Cy3/Cy5/Cy7 Penta LED HC Filter Set der Firma Semrock basiert:

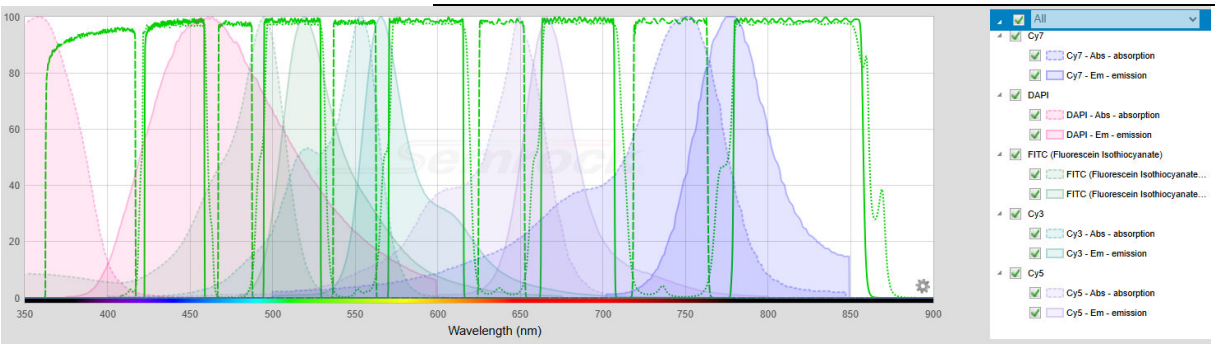

Abb. 5-2 Multibandpassfilter für DAPI/FITC/Cy3/Cy5/Cy7 (Daten aus Semrock Searchlight)

Hier genügt ein Filtersatz für alle Kanäle und es kann auf einen aufwändigen mechanischen Filterwechsler verzichtet werden, was (allerdings zu Lasten des Signals und des cross talks) die Geräte-Kosten deutlich reduzieren kann.

5.2. xy-Positionierung und Fokussierung

Um auch größere Strukturen (z.B. Gewebeschnitte) abzubilden, müssen ggf. mehrere Einzelbilder sauber aneinander gestückelt werden (sog. Stitching). Das funktioniert jedoch nur, wenn die Abweichungen der jeweiligen Positionen in x-und y-Richtung zwischen den einzelnen Bildern nicht zu groß sind.

Wie schon im Kapitel 2 beschrieben, hat sich bereits vor Beginn dieses Projektes gezeigt, dass die Genauigkeit des bereits existierenden „*advanced performance*" Labormusters mit riemen-getriebenen Positioniereinheiten in der xy-Positionierung von bis zu 300µm und in der Fokussierung von bis zu 4µm dazu bei weitem nicht ausreicht. Im Rahmen des NeuroMir-Projektes musste deshalb das gesamte Positionier- und Fokussiersystem komplett neu entwickelt werden. Anstelle eines Riemenantriebes werden alle 3 Achsen jetzt mit Spindeln angetrieben. Dabei wurde ein vernünftiger Kompromiss zwischen der Genauigkeit der Positionierung und Fokussierung sowie dem notwendigen Aufwand und den damit verbundenen Kosten je Gerät gesucht.

Systeme mit einer zusätzlichen aktiven Regelschleife und einer piezoelektrischen Positionierung erreichen sehr hohe Genauigkeiten, sind aber auch sehr teuer. Gemeinsam mit den Projektpartnern sind wir aus Anwendersicht von einer sinnvollen Positioniergenauigkeit von 25µm in x- und y-Richtung sowie von 1µm für die Fokussierung ausgegangen.

Die mittels Schrittmotoren und Spindeln angetriebene xy-Positioniereinheit bewegt einen über einen Deckel im Gerät entnehmbaren Rahmen, in dem entweder bis 5 je 25mm x 75mm große slides oder eine well plate eingesetzt werden können. Um alle Bereiche der Probe beobachten zu können, muss der Verfahrbereich mindestens 90mm x 135mm groß sein. Dabei soll die maximale Verfahr-geschwindigkeit mindestens 50mm/s betragen. Die gesamte xy-Positioniereinheit wird mit 4 Ständern stabil auf die Grundplatte des Gerätes montiert.

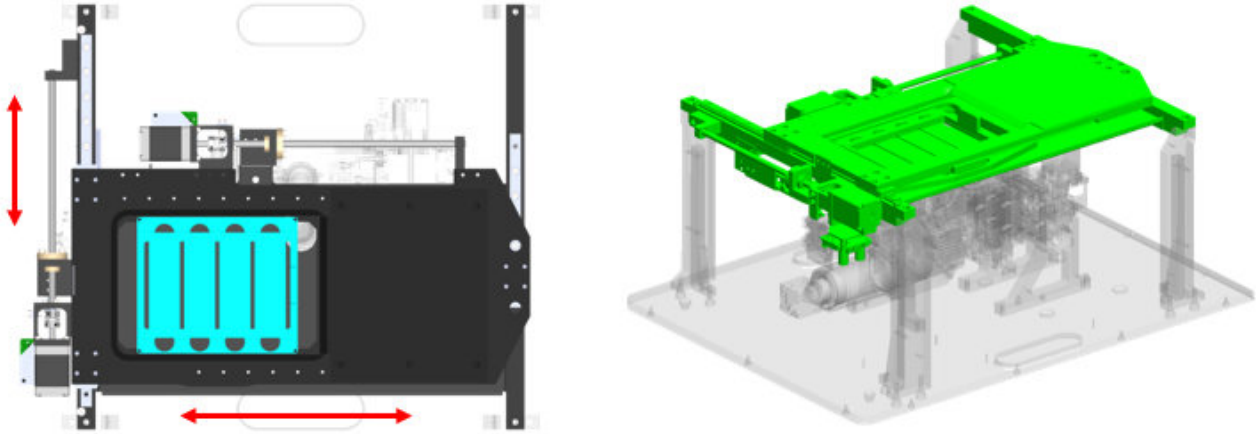

Abb. 5-3 komplett überarbeitete spindelgetriebene xy-Positioniereinheit

Um die Positioniergenauigkeiten in x- und y-Richtung messtechnisch zu bewerten, wurde ein kommerzielles laserbasiertes Triangulations-System verwendet. Die Ergebnisse waren leider nicht brauchbar, da die Ungenauigkeiten des Systems und dessen Einbau in der Größenordnung der Messwerte selbst lagen. Wir haben deshalb eine eigene Messroutine entwickelt, die die bereits im Gerät selbst vorhanden Komponenten nutzt und keine zusätzliche externen Messmittel benötigt: das Bild eines slides mit einem Fadenkreuz wird mit der Optik und der Kamera des Fluoreszenz-Mikroskops selbst jeweils vor und nach Bewegungen in 8 Richtungen (horizontal, vertikal und diagonal) aufgenommen und die Positionsabweichungen mittels Software bestimmt.

Dabei hat sich gezeigt, dass die „Punktwolke der Positions-Koordinaten“ im Bereich der geforderten Toleranz von maximal 25µm liegt:

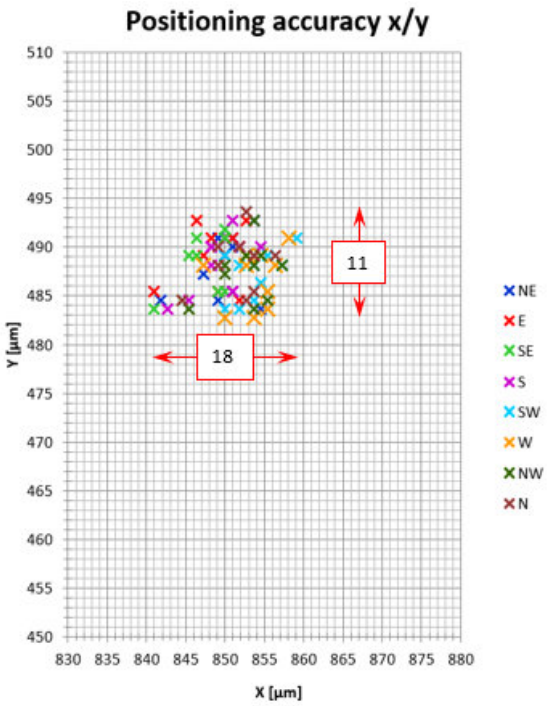

Abb. 5-4 typische Messung der xy-Positioniergenauigkeit nach Bewegungen in alle 8 „Himmelsrichtungen“

Das optische System wird mittels einer vertikalen Bewegung (z-Richtung) des Mikroskop-Objektivs fokussiert. Dabei wurde zu Projektbeginn die existierende, aber mit bis 4µm Abweichung viel zu

ungenaue, riemengetriebene Fokussierung ebenfalls komplett überarbeitet und durch ein spindel-getriebenes und mittels Hebel zusätzlich 1:5-fach untersetztes neues System ersetzt:

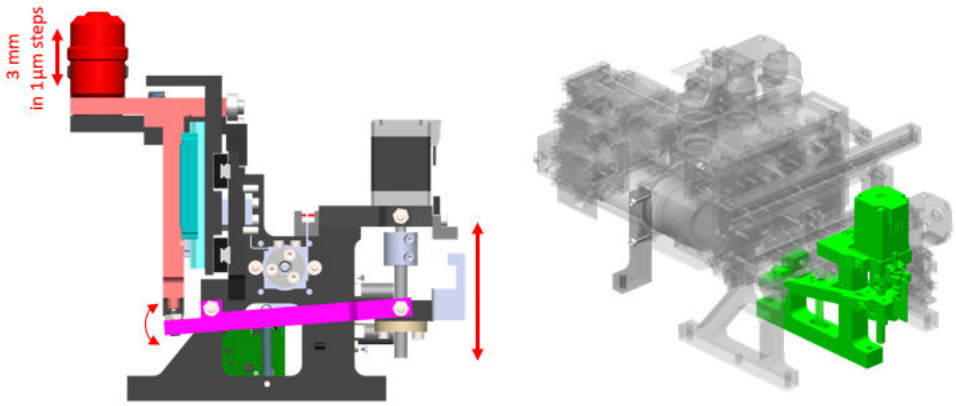

Abb. 5-5 komplett überarbeitete Fokussiereinheit

Es wird ein mechanischer Fokussierbereich von insgesamt 3mm abgedeckt. Über die Bedien-oberfläche kann manuell (in verschiedenen Schrittweiten) fokussiert werden oder eine automatische, kontrastbasierte Fokussier-Routine gestartet werden, die intern in einem Grob- und Fein-Fokus unterteilt ist. Dabei werden in definierten z-Abständen Einzelbilder aufgenommen und final auf die (Fokus-) Ebene mit dem größten Kontrast positioniert. Das funktioniert nur, wenn beim Anfahren der optimalen Fokusposition eine Genauigkeit von etwa 1µm erreicht wird.

Analog zur messtechnischen Bewertung der Genauigkeit der xy-Positionierung wurde ein Verfahren zur Bewertung der Fokussiergenauigkeit entwickelt und implementiert:

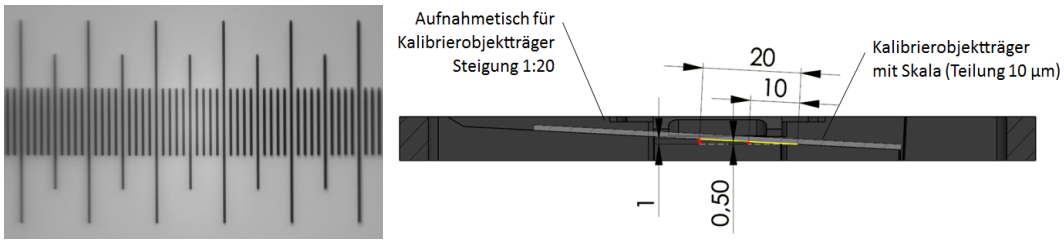

Abb. 5-6 Prinzip zur Messung der Fokussiergenauigkeit

Um auch hier die bereits im Mikroskop vorhandene Kamera als Detektor verwenden zu können, wurde ein slide mit einer linearen Skala leicht (1:20) schräg gestellt, so dass sich bei einer (De-) Fokussierung der scharf abgebildete Bereich linear verschiebt. Mittels einer Software wurde der „am schärfsten abgebildete Bereich“ detektiert und daraus die relative z- (also Höhen-) Änderung berechnet. Damit konnte messtechnisch eine Genauigkeit der Positioniereinheit von ca. 1µm nachgewiesen werden.

5.3. Objektiv- und Filterwechsler

In den initialen Diskussionen mit den Projektpartnern wurde der Wunsch nach mehr Flexibilität bei der Detektion verschieden großer Proben geäußert. Für die hier entwickelten Prototypen wurde

deshalb ein 3-fach, automatischer, mittels Schrittmotoren bewegter Objektivwechsler entwickelt und verbaut:

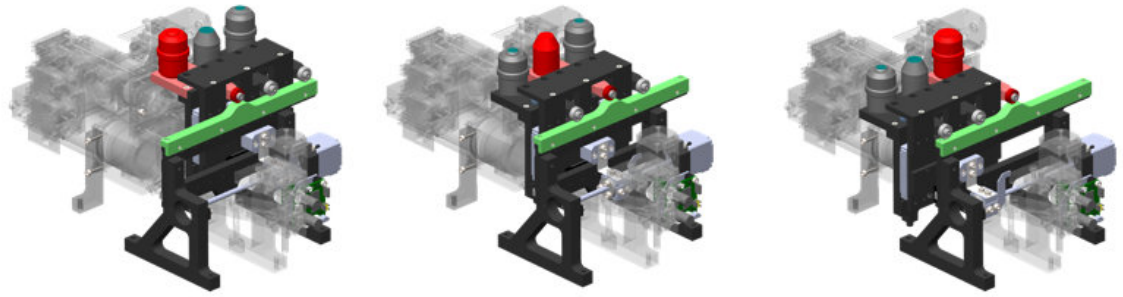

Abb. 5-7 motorisch betriebener automatischer Objektivwechsler für 3 Objektive

Zwischen den 3 Objektiven (hier mit 10x, 20x und 40x Vergrößerung) kann jeweils innerhalb von 1 Sekunden gewechselt werden, wobei das jeweils neue Objektiv bereits automatisch sehr genau „vorfokussiert“ wird.

Ebenfalls zur Erhöhung der Flexibilität des Fluoreszenz-Mikroskops für die Detektion von mit verschiedenen Fluorophoren im VIS- als auch im NIR-Bereich markierten Proben wurde ein 2-fach, automatischer, mittels Schrittmotoren bewegter Filterwechsler entwickelt und verbaut:

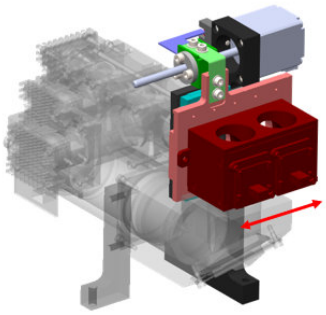

Abb. 5-8 motorisch betriebener automatischer 2fach Filterwechsler

Damit kann einer der Fluoreszenzkanäle (z.B. Cy7 im NIR) losgelöst von den anderen (hier DAPI und FITC im VIS) optimiert werden. Der Filterwechsel erfolgt dabei in ca. 1 Sekunde.

5.4. Elektronik, Systemsteuerung und Software

Die Elektronik des Fluoreszenzmikroskops wurde mit dem Ziel hoher Flexibilität, langfristiger Wartbarkeit und guter elektromagnetische Verträglichkeit bei möglichst hoher Kosteneffizienz modular und dezentral aufgebaut. Das System besteht aus den folgenden Hauptkomponenten, die im Folgenden näher beschrieben werden:

- Intel NUC PC-Modul zur zentralen Ablaufsteuerung
- dezentrale Motorsteuerungen (je eine pro Antrieb; insgesamt fünf)
- LED-Ansteuerung.

Die Grundstruktur der Elektronik ist im Blockschaltbild in der Abbildung 5-9 dargestellt.

Die Motorsteuerungen, Kamera und die LED-Ansteuerung sind über USB mit dem Rechner verbunden. Durch die Verwendung des gängigen Standardinterfaces USB wird im Sinne eines effektiven Life-Cycle-Managements die einfache Austauschbarkeit einzelner Subkomponenten im Falle einer Abkündigung ermöglicht.

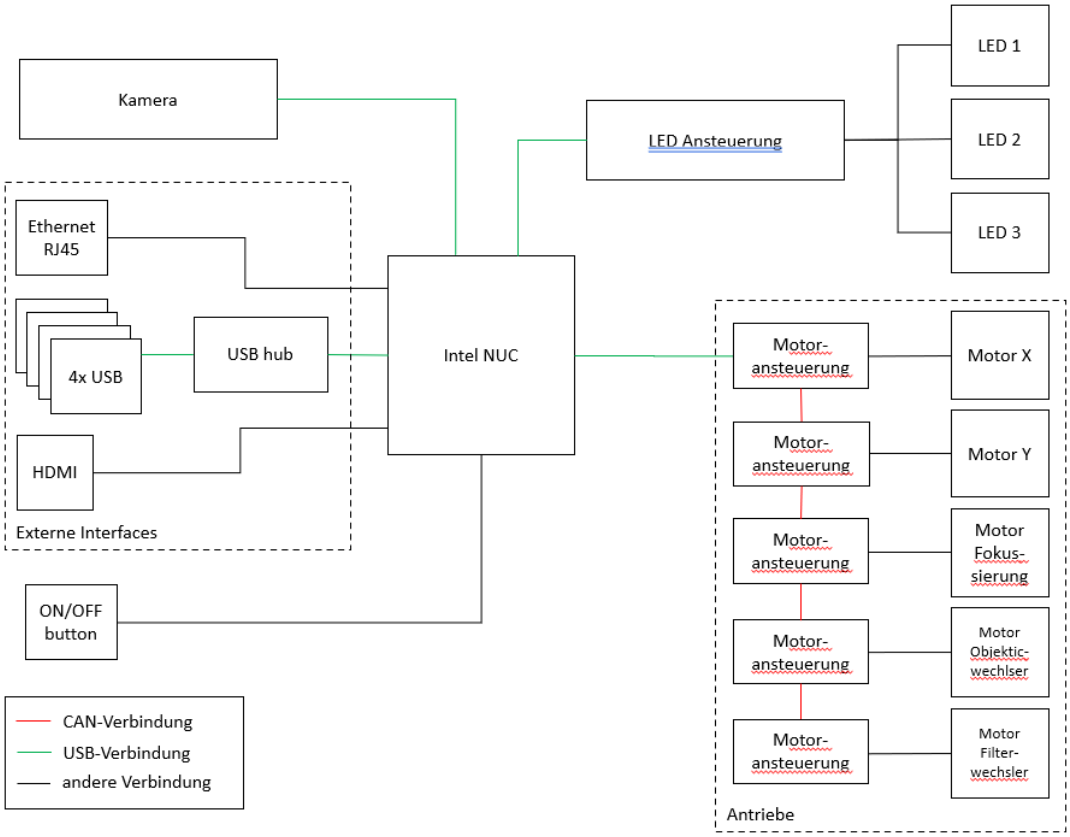

Abb. 5-9 Blockschaltbild der Geräte-Elektronik und -Kommunikation

Intel NUC PC-Modul:

Im Zentrum steht ein kompakter Intel NUC Mini-PC für die zentrale Steuerung und die Steuerung sämtlicher elektronischen Subsysteme des Fluoreszenzmikroskops. Im Rahmen des Förderprojektes wurde der Rechner auf die neuste i3 Chip-Generation umgestellt, um hier die volle Verfügbarkeit über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten und die bessere Energieeffizienz, die diese Generation bereitstellt, zu nutzen. Dank seiner standardisierten x86-Architektur können auf dem NUC sowohl kommerzielle als auch individuell entwickelte Softwarelösungen flexibel betrieben werden. Dies ermöglicht eine einfache Anbindung an bestehende Software, Remote-Zugriff über Netzwerk-Schnittstellen sowie die unkomplizierte Integration von Firmware-Updates, Diagnosetools oder automatisierten Workflows. Darüber hinaus erlaubt die modulare Auslegung des Rechners eine spätere Aufrüstung von RAM oder SSD, was die Skalierbarkeit in Hinblick auf zukünftige Anforderungen deutlich erhöht.

Motorsteuerung:

Kern der Entwicklungsaufwände in der Elektronik des Fluoreszenzmikroskops war das Design einer optimierten „eigenen“ Schrittmotoransteuerung. Diese sind speziell auf die Anforderungen der im Gerät verwendeten Schrittmotoren ausgelegt, welche für

- die Positionierung der X-Y-Tischachse,
- die Fokussierung sowie
- den Wechsel von Objektiven und Filtern

benötigt werden. Insgesamt sind fünf dieser Controller im System integriert. Die Neuentwicklung des Controllerboard für die Motorsteuerung des *„advanced performance“* Systems wurde angestrebt, um hier die Vorteile der Flexibilität bei der Ansteuerung der Motoren, interne Standards bei Hardware-Komponenten, die Unabhängigkeit von speziellen Lieferanten, interne einheitliche Programmier-methoden mit zugehöriger Dokumentation zu realisieren und den Kostenvorteil bei einer zukünftigen höheren Stückzahl nutzen zu können. Die Entscheidung für ein dezentrales Konzept erfolgte mit dem Ziel, die Anbindung der Motoren an die Endstufen möglichst kurz zu halten. Dadurch sollten elektromagnetische Störaussendungen beim Motorbetrieb minimiert werden, um im späteren Zulassungsprozess nach EMV-Richtlinie potenzielle Probleme zu vermeiden.

Neben den Anschlüssen für die Schrittmotoren verfügen die Motorcontroller über Eingänge für Lichtschranken, die zur Initialisierung und Referenzierung der Antriebe dienen. Zudem stehen Kommunikationsschnittstellen (CAN und USB), ein digitaler Ausgang (3,3 V, max. 400 mA) sowie ein im Projekt nicht genutzter Eingang für den Anschluss eines Encoders zur Verfügung.

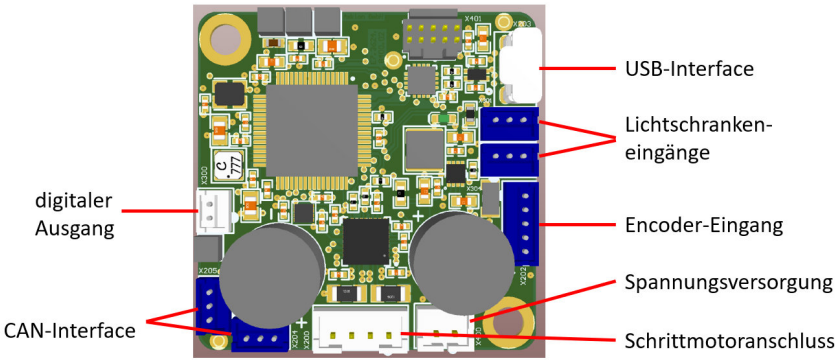

Abb. 5-10 Platine der neu entwickelten Motorsteuerung

Die Firmware läuft auf einem LPC-Mikrocontroller der Firma NXP, der sich durch seine gute Verfügbarkeit, niedrigen Stückpreis und die Integration aller erforderlichen Peripherieschnittstellen (PWM, CAN, digitale Ein-/Ausgänge, UART) auszeichnet. Für die strukturierte Abarbeitung paralleler Aufgaben wie Motorsteuerung, Sensorabfrage und Kommunikation wird ein Echtzeitbetriebssystem (FreeRTOS) eingesetzt. Die Firmware ist in C++ implementiert und folgt einer modularen Architektur, die eine einfache Erweiterung und Wartung des Codes ermöglicht.

Die fünf Motorcontroller kommunizieren untereinander über einen CAN-Bus, der sich durch seine Echtzeitfähigkeit, hohe Störsicherheit und einfache Topologie-Erweiterung auszeichnet. Der Motorcontroller für den Antrieb der X-Achse des Probentisches übernimmt dabei die Master-Funktion. Er ist per USB mit dem Intel NUC-PC verbunden und Verteilt die Steuerungsbefehle des NUC via CAN an die nachgelagerten Motorcontroller. Dieses Konzept erlaubt eine Ansteuerung der

dezentralen Motorcontroller auch ohne native CAN-Schnittstelle im NUC selbst bei gleichzeitiger Erweiterbarkeit des Systems.

LED-Ansteuerung:

Ein weiterer Elektronikbaustein ist die LED-Steuerung, die über einen eigenen Mikrocontroller realisiert ist. Diese Komponente wurde von der Firma OUT als OEM-Lösung bereitgestellt und wird über eine USB-Schnittstelle mit dem NUC verbunden. Dadurch ist eine flexible Ansteuerung unterschiedlicher Beleuchtungsmodi möglich, etwa zur Anregung fluoreszierender Proben.

Die gesamte Spannungsversorgung des Systems erfolgt über ein externes Tischnetzteil. Der Einsatz eines externen Netzteils bietet mehrere Vorteile: Zum einen wird dadurch die Wärmeentwicklung aus dem Gehäuse des Geräts verlagert, was die thermische Stabilität verbessert. Zum anderen vereinfacht sich die Wartung und der Austausch bei Defekten, da keine Öffnung des Geräts notwendig ist. Die Spannungsaufbereitung und Verteilung innerhalb des Geräts erfolgt über separate DC-DC-Wandler und Schutzbeschaltungen, die auf den jeweiligen Controllerplatinen integriert sind.

Die gesamte Elektronik wurde im Hinblick auf Langzeitverfügbarkeit, Modularität und einfache Integration entwickelt. Durch die Verwendung proprietärer, intern entwickelter Controllerplatinen ist das System unabhängig von einzelnen Zulieferern und lässt sich bei steigenden Stückzahlen kosteneffizient skalieren. Zudem ermöglicht die einheitliche Hardwareplattform eine homogene Firmware-Entwicklung und konsistente Systemdokumentation.

6. Inbetriebnahme, Test und Übergabe der Prototypen

Nach Abschluss der im Kapitel 5 beschriebenen Entwicklungen und Optimierungen wurden sukzessive jeweils 3 Prototypen des Fluoreszenz-Mikroskops für die Detektion sowohl im VIS als auch im NIR aufgebaut, in Betrieb genommen und intensiv getestet. Zwei dieser Prototypen wurden für weitere Messungen und biologische Validierungen an die Projektpartner übergeben, das dritte System verbleibt als technisches Referenzgerät bei Askion.

In der Abbildung 6-1 ist das aus dem stand alone Gerät selbst, einem Einlegerahmen für die Proben (bis zu 5 Slides), Monitor, Maus und Tastatur bestehenden finale Gesamtsystem dargestellt:

Abb. 6-1 Prototyp des erweiterten Fluoreszenzmikroskops zur Detektion im VIS und im NIR

Es erfolgte eine ausführliche Verifizierung und Validierung dieser Prototypen zunächst aus gerätetechnischer Sicht unter Berücksichtigung der Ergänzungen, Optimierungen und Änderungen gegenüber dem einkanaligem NIR-Labormuster. Im zweiten Schritt wurden dann wieder gemeinsam mit der BTU Messungen mit realen biologischen Proben durchgeführt und ausgewertet. In Abb. 6-2 ist als ein Beispiel die Messung einer Konzentrationsreihe gelabelter magnetischer Beads dargestellt:

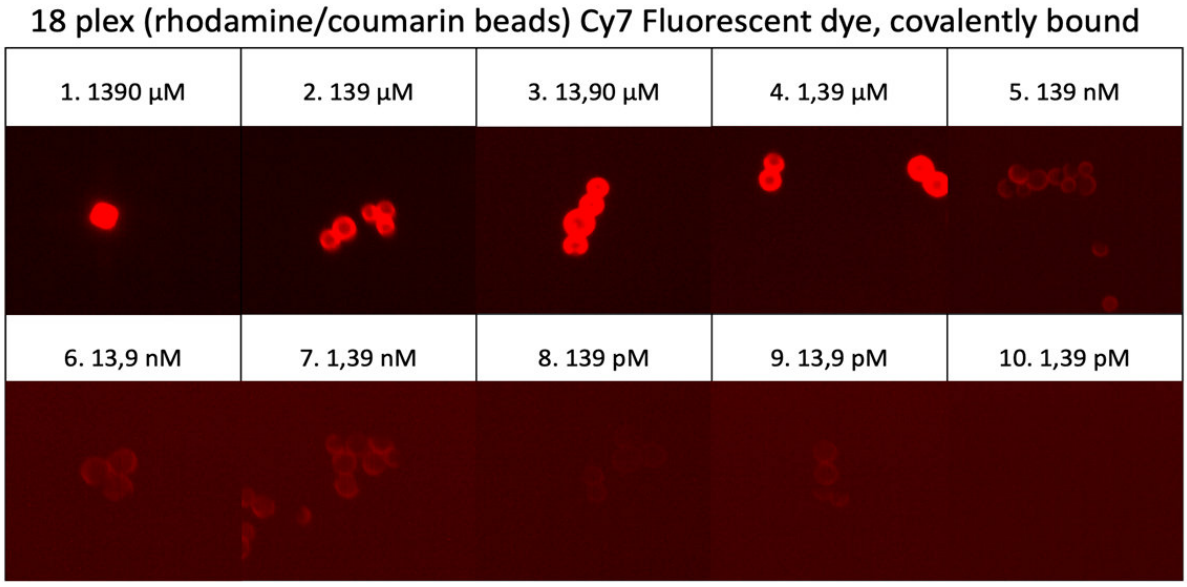

Abb. 6-2 Beispiel für die Messung einer Konzentrationsreihe

In der Auswertung der Daten hat sich leider gezeigt, dass die angestrebten Nachweisgrenzen des miRNA-Test im Bereich von 10 pg/ml nicht vollständig erreicht werden konnten. Die 10 pg/ml miRNA entsprechen dabei bei 22 nt Länge der miRNA etwa 1,4 pM.

Ursache dafür waren aber nicht nur technische Limitationen der im Rahmen des Projektes entwickelten und aufgebauten Prototypen der für die Detektion im VIS und NIR geeigneten automatisierten Fluoreszenz-Mikroskope. Leider konnten am Ende die Fluoreszenzsignale molekularbiologisch nicht ausreichend verstärkt werden, siehe dazu die Details im Bericht der BTU. Um das zu kompensieren, hätte die Fluoreszenz-Mikroskope noch deutlich sensitiver sein müssen, was aber nicht vorhersehbar war und den Rahmen des hier beschrieben Projektes deutlich gesprengt hätte.

Gerätetechnische Effekte wie z.B. ovale statt runde Beads oder Unschärfe am Rand der Bilder wurden bei der Inbetriebnahme beobachtet und die Systeme iterativ verbessert und optimiert.

7. Zusammenfassung und Ausblick

7.1. Zusammenfassung

Ziel des hier beschriebenen Förderprojektes war die Entwicklung und der Aufbau von Prototypen eines kompakten, modularen und automatisierten Fluoreszenz-Mikroskops zur Detektion von Fluorophoren sowohl im visuellen (VIS) als auch im nahem infrarotem (NIR) Wellenlängenbereich.

Die Entwicklung basierte dabei in der ersten Stufe auf einem bereits entwickelten Prototyp eines kompakten *„low cost“* Fluoreszenzmikroskops, das als einkanaliges System für erste Tests zum Nachweis einer sicheren Detektion im NIR für Cy7 und Cy7.5 modifiziert wurde.

Nachdem damit die prinzipielle Machbarkeit sicher nachgewiesen werden konnte, wurden die eigentlichen zur Detektion im VIS und (!) NIR geeigneten Systeme konzipiert, entwickelt, aufgebaut, ausführlich getestet und den Projektpartnern zur Verfügung gestellt. Grundlage dafür waren die Entwicklungen eines inversen *„advanced performance“* Fluoreszenzmikroskops im Status eines Laboraufbaus.

7.2. Erweiterung zu einem System mit hohem Probendurchsatz

Die Prototypen des NIR-Fluoreszenzmikroskops können mit einer well plate oder mit bis zu 5 slides beladen werden, die mittels der implementierten Software-Routinen in einem automatischen Ablauf gescannt werden.

Diskussionen mit den Projektpartners und mit weiteren potentiellen Kunden haben gezeigt, dass es generell auch einen Bedarf für automatische Messungen einer größeren Probenanzahl (z.B. über Nacht), gibt.

Ein solcher höherer Probendurchsatz kann mit Hilfe einer robotischen Be- und Entladung der Racks mit den einzelnen Proben realisiert werden. Im Rahmen des Projektes wurde ein entsprechender Demonstrator entwickelt und aufgebaut. Er basiert auf einem kommerziell erhältlichem Robotik-Arm (hier ein PreciseFlex 3400 von Brooks) und einem so genannten Plate Hotel mit einem Satz von mit Proben beladenen Racks. Die einzelnen Racks werden vom Plate Hotel in das / aus dem Fluoreszenz-Mikroskop bewegt, das dafür zusätzlich mit einem motorisch betriebenen Deckel versehen wurde.

Abb. 7-1 Demonstrator zur automatischen Be- und Entladung von Proben in das Fluoreszenzmikroskop

Um den Gesamtablauf beim Detektieren einer großen Anzahl von Proben noch sicherer zu machen, werden Barcodes an den Racks und den einzelnen Slides im Gerät gescannt, um die aufgenommen Bilder sicher den richtigen Proben zuordnen zu können.

7.3. Ausblick

Die im Rahmen des hier beschriebenen Förderprojektes entwickelten und aufgebauten Geräte stehen für weitere Tests und ggf. Anpassungen bzw. Optimierungen bei den Projektpartnern zur Verfügung und ermöglichen ihnen eine Weiterentwicklung der Biochemie.

Anpassungen an weitere bzw. andere Fluorophore sowohl im VIS als auch im NIR sind mit relativ wenig Aufwand leicht möglich (mittels Auswahl und Integration angepasster LED und optische Filter ohne weitere Eingriffe in das optische, mechanische und elektronische Grundsystem sowie in die Software zur Systemsteuerung), was ein großer Vorteil des hier entwickelten modularen Systems ist.

Der Einsatz anderer Probenformate (z.B. kundenspezifischer Cartridges) statt der bisher hier verwendeten Mikroskopie-Slides oder Well Plates ist (bei maximaler Größe einer Well Plate) ebenfalls leicht möglich.

Inzwischen haben auch bereits erste kommerzielle Kunden Interesse an der NIR-Erweiterung unserer Fluoreszenz-Mikroskope gezeigt und erste technische Diskussion zur Implementierung ihrer spezifischen Anwendungen begonnen. Da aber auch hier spezifische technische Anpassungen notwendig sind, werden noch ca. ein bis zwei Jahren bis zu ersten Verkäufen von NIR-geeigneten Fluoreszenz-Mikroskopen vergehen. Die positive Resonanz sowohl auf den Projekt-Veranstaltungen als auch in Diskussionen mit potentiellen Kunden auf verschiedenen Messen zeigen, dass ein großer Markt für automatisierte Fluoreszenz-Mikroskope zur Detektion sowohl im VIS- als auch im NIR-Bereich besteht und Askion die entsprechende Gerätefamilie weiter entwickeln wird. Im Laufe des Projektes hat sich allerdings herausgestellt, dass die im Projektantrag genannten Verkaufspreise nicht realistisch sind und sich, je nach konkreter Konfiguration, eher im Bereich von 25.000€ bis 40.000€ bewegen werden. Die ersten Stückzahl-Prognosen aus dem Projektantrag halten wir für die nächsten 4 … 5 Jahre nach Projektende weiter für realistisch, die Prognose über mehr als 1000 Geräte im Jahr 10 nach Projektende war allerdings wahrscheinlich zu optimistisch.