

ANÁLISIS ÓPTICO DE MICRO-MATRICES DE FLUORESCENCIA SOBRE SOPORTES DE GRABACIÓN DIGITAL CONVENCIONALES

David Mira
Centro de Tecnología
Nanofotónica
Universidad Politécnica de
Valencia
damisal@ntc.upv.es

Roberto Llorente
Centro de Tecnología
Nanofotónica
Universidad Politécnica de
Valencia
rllorent@ntc.upv.es

Ángel Maquieira
Departamento de Química
Universidad Politécnica de
Valencia
amaquieira@qim.upv.es

Javier Martí
Centro de Tecnología
Nanofotónica
Universidad Politécnica de
Valencia
jmarti@ntc.upv.es

Abstract- In this paper is reported the optical parallel analysis of Cy5 fluorophore micro-arrays over polycarbonate and polyethylene metacrilate substrates as those found in standard digital recording media. The sequential printing of biochemical samples, CCD detection, enhanced analysis by signal processing and assay results recording as digital data on a consolidated substrate is implemented. The developed equipment finds its application in low-cost ultra high throughput screening of massive chemical, biochemical or cellular agents.

I. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de análisis paralelo de alto rendimiento (HTS “High Throughput Screening”) aprovechan la miniaturización y el tratamiento en paralelo de los análisis. La deposición y el análisis de micro-matrices (diámetro de muestra entre 100 y 200 μm), integrado en un mismo equipo es la solución al volumen de análisis requerido en campos como la genómica y la proteómica. Estas micro-matrices son utilizadas principalmente en medicina y biología molecular, su aplicación abarca alimentación, medioambiente y aplicaciones de seguridad y defensa. Hasta la fecha principalmente se utilizan dos técnicas para el análisis paralelo de estas micro-matrices: (i) El barrido con láser y detección con tubo fotomultiplicador (PMT “Photo-Multiplier Tube”), y (ii) Excitación mediante una fuente de luz blanca y detección con un sistema CCD.

El uso de CCDs de cámaras digitales comerciales en la detección directa de fluorescencia es una solución de bajo coste para aplicaciones con requerimientos de análisis medios [1], otra ventaja de los equipos basados en CCD es la posibilidad de detectar simultáneamente señales fluorescentes y bioluminiscentes [2]. Este esquema ha sido aplicado con éxito en inmunoensayos o métodos basados en hibridación de ácidos nucleicos [3][4] pero se requieren tiempos de integración largos. Los continuos avances en los marcadores fluorescentes y en la sensibilidad de los CCDs reducen este tiempo y permiten su uso en aplicaciones HTS.

El nivel de reacción de cada elemento de la matriz se evalúa mediante la detección directa de la intensidad de

fluorescencia. Hasta la fecha se han descrito otras técnicas de detección de fluorescencia tales como: (1) Espectroscopia de correlación de fluorescencia [5][6], (2) Microscopio confocal de fluorescencia, (3) Muestreo de fluorescencia basado en la duración de la emisión [7] y (4) Microscopio de reflexión total interna. Todas estas técnicas requieren de fuentes de luz monocromáticas de alta intensidad (comúnmente láseres de onda continua o pulsados) y detectores PMT los cuales son equipos costosos. Asimismo, los periodos de exposición largos a una intensa iluminación limitan su viabilidad en células y tejidos e introducen un fenómeno de fotodecaimiento (“photo-bleaching”). Las cámaras CCD de alta eficiencia cuántica son la solución para sustituir a los detectores PMT.

En este trabajo de longitud de onda de excitación se consigue mediante un económico conjunto de matrices de LEDs (“Light Emitting Diodes”) y filtros si es necesario optimizar al máximo posible la respuesta del sistema, los cuales pueden configurarse de manera que permitan el análisis de diferentes fluoróforos de manera sencilla y económica. La excitación limitada en ancho de banda de los LEDs es más eficiente que la excitación de las fuentes de luz blanca. Además, los resultados demuestran un funcionamiento equivalente al de los microscopios basados en láser. Por otra parte, el esquema basado en LED/CCD que proponemos tiene las ventajas de permitir multidetección (ensayos en paralelo), portabilidad, rapidez y sencillo ajuste para diferentes fluoróforos.

II. DEMOSTRADOR HTS

En la Figura 1 se muestra un esquema del funcionamiento del demostrador HTS implementado. Como puede observarse, integra todos los pasos de un análisis: (a) deposición de las micro-matrices, (b) detección de la reacción de marcado, (c) software de análisis y (d) almacenamiento digital de los datos resultantes del análisis. Los objetivos del diseño son alcanzar un coste global de sistema reducido y mantener una arquitectura abierta para favorecer migraciones a nuevos escenarios de análisis (diferentes marcadores o sustratos). La estrategia del sistema se basa en usar como sustrato medios de grabación digitales

disponibles comercialmente, tales como CD-R, CD-RW, DVD-R o DVD-RW, compuestos de policarbonato y polietileno metacrilato en sus dos caras respectivamente. De esta manera nos beneficiamos de la capacidad de almacenamiento de los mismos, permitiendo grabar información administrativa en el mismo sustrato en el que se encuentran las muestras bioquímicas. Así pues, el sustrato se convierte en un método compacto de almacenamiento simultáneo adecuado tanto para las muestras como para los resultados, permitiendo posteriores análisis.

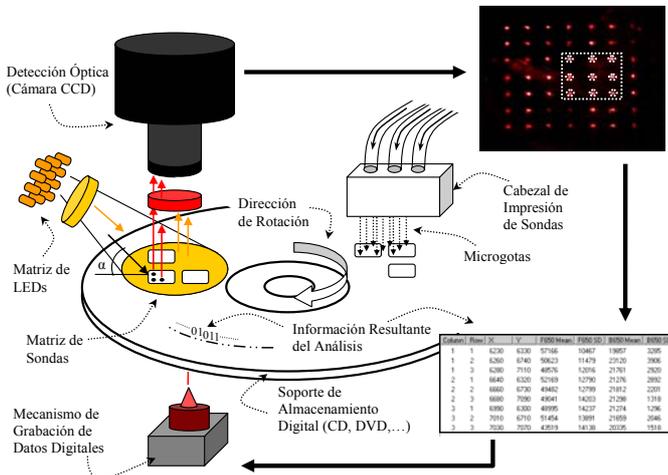


Fig. 1. Demostrador HTS para la detección de fluorescencia mediante LED/CCD.

El proceso, tal y como se muestra en la Figura 1, es el siguiente: un cabezal de impresión de tinta deposita las micro-matrices en la superficie del CD-RW, el sistema de detección compuesto por LED/CCD evalúa el nivel de reacción de todas las muestras, y finalmente los resultados del análisis se graban en el CD-RW junto con las condiciones del análisis y otros datos que puedan resultar de interés.

La intensidad de fluorescencia detectada por el CCD se usa para evaluar el nivel de hibridación de la muestra. La Figura 2(A) muestra el esquema de detección de fluorescencia del sistema LED/CCD propuesto. El uso de detectores de bajo coste tiene la desventaja de producir ruido de fondo relativamente alto. El ruido de fondo se reduce mediante el uso de filtros de emisión y excitación, (F1) y (F2) en la Figura 2(A). Podemos comparar este esquema con el de la Figura 2(B), que muestra un esquema de detección convencional basado en detector CCD y fuente de luz blanca.

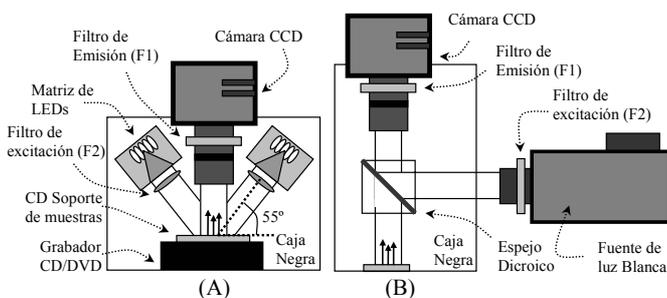


Fig. 2.- (A) Esquema de detección de fluorescencia basado en LED/CCD. (B) Esquema convencional de detección basado en CCD.

A continuación se describirán las diferentes partes que componen el sistema

A. Sistema Piezoeléctrico de Deposición

La deposición del analito se realiza mediante un sistema de inyección piezoeléctrico compuesto por un cabezal de inyección de tinta con seis depósitos independientes para las muestras, etiquetas, y soluciones necesarias en el proceso químico. El sistema trabaja con tamaños de gota inferiores a $100\mu\text{m}$ de diámetro (con un volumen mínimo de 4 picolitros). Esto nos proporciona un gran número de muestras por centímetro cuadrado, de manera que sobre un mismo CD pueden realizarse multitud de análisis. El proceso químico fija la muestra sobre la superficie de un CD-RW convencional en la capa de policarbonato o en la de metacrilato. Además pueden añadirse métodos que aumenten la sensibilidad de la detección, tales como adherir una membrana a la superficie que mejore la respuesta del marcador, obteniendo mejor SNR, y por tanto más sensibilidad. La elección dependerá de los requerimientos particulares del análisis a realizar.

B. Fuente de excitación basada en LEDs

Para excitación de la fluorescencia usamos iluminación lateral (con un ángulo de 55° respecto a la superficie del sustrato) mediante matrices de LEDs de alta intensidad, con una potencia de iluminación total de 150mW. Esta configuración está optimizada para eliminar el ruido de fondo, que puede llegar a ser muy intenso debido a la gran reflectividad de la superficie del CD-RW. El modelo de LED seleccionado (Toshiba TLOH157P) se ajusta a la longitud de onda de excitación del Cy5, fluoróforo elegido para la realización de todas las pruebas. Sin embargo el espectro de emisión del LED no está localizado exactamente en el pico de absorción del Cy5, como puede verse en la Figura 3 (eficiencia de absorción de 35% a la frecuencia de emisión del LED), de esta manera tratamos de separar la respuesta espectral del LED del espectro de emisión del fluoróforo, la finalidad de este hecho es reducir el ruido de fondo producido por el solape entre excitación/emisión y por lo tanto aumentar la SNR. Es posible mejorar la respuesta del sistema usando un filtro óptico para eliminar los armónicos producidos por el LED que pueden interferir en la banda de emisión del Cy5.

Normalmente la excitación de la fluorescencia se realiza mediante lámparas de xenon, mercurio o argón con potencias entre 50 y 200 W [8]. Todas estas lámparas son voluminosas y requieren del uso de fuentes de alta tensión. En el esquema propuesto, la excitación se produce mediante dos matrices de económicos LEDs. La eficiencia de iluminación del proceso total es del 32.4%, valor calculado a partir del área de solape entre la respuesta espectral del LED y la banda de paso del filtro de excitación (Figura 3). En el caso de las fuentes de luz blanca, la eficiencia de iluminación es mucho menor debido a que la luz que pasa a través del filtro es tan sólo un pequeño porcentaje de la potencia óptica total. La iluminación mediante LED además de ser más eficiente, es más duradera, no tiene problemas de calentamiento, y permite el diseño de sistemas más compactos y económicos

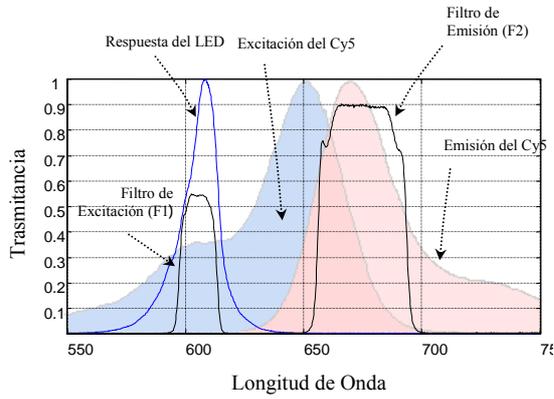


Fig. 3.- Respuesta de la matriz de LEDs, Respuesta del filtro de excitación, Respuesta espectral de emisión/excitación del fluoróforo (Cy5) y Respuesta del filtro de emisión.

C. Detector CCD

Las especificaciones necesarias para realizar análisis de micro-matrices son principalmente: (a) una $SNR \geq 3^6$ definido por (1), y (b) un rango dinámicos no inferior a 50dB (dos órdenes y media de magnitud).

$$SNR = \frac{\text{Nivel de señal} - \text{Nivel de fondo}}{\text{Desviación Típica del Fondo}} \quad (1)$$

Destacar que en aplicaciones prácticas, el proceso químico es el que marcará el límite inferior de detección. El componente CCD no limitará las aplicaciones prácticas ya que se ajusta perfectamente a los requerimientos de los ensayos con fluorescencia.

El factor limitante en un mecanismo de detección CCD es el ruido. Existen dos principales fuentes de ruido: (1) la corriente de oscuridad, generada por calor, y que por tanto puede ser eliminada/reducida mediante dispositivos de enfriamiento (Peltier $\rightarrow -20^\circ\text{C}$, Nitrógeno $\rightarrow -40^\circ\text{C}$), esto permitirá aumentar drásticamente los tiempos de integración, y (2) el ruido eléctrico, los CCDs actuales alcanzan valores <10 electrones por celda [9]. Así pues el voltaje de salida de cada píxel del CCD (V_o) viene dado por:

$$V_o = gQ_T = g(Q + Q_{osc} + Q_{lec}) = g \left(\int_0^{T_{int}} (i(t) + i_{osc}) dt \right) + g(Q_{lec}) = g \left(\int_0^{T_{int}} (\eta(\lambda) I_{inc}(t) + i_{osc}) dt \right) + g(Q_{lec}) \quad (2)$$

La cámara CCD tendrá un ruido de fondo mínimo compuesto por el error de lectura y el error de corriente de oscuridad. La ecuación (2) incluye el error total medido en cada píxel, donde g es la ganancia de conversión, Q_T equivale a la carga total del píxel, Q es la carga debida a la fotocorriente, Q_{osc} la carga debida a la corriente de oscuridad, Q_{lec} la carga de error de lectura del píxel y $\eta(\lambda)$ es la respuesta espectral del detector a la longitud de onda de trabajo. En esta ecuación, la mayor contribución al error es la corriente de oscuridad, la cual incrementa con el tiempo de exposición (T_{int}).

En nuestro caso, para la detección usamos un sistema basado en una cámara CCD de alta sensibilidad [9] refrigerada por Peltier con una resolución de 1392×1040 pixels cuya señal es muestreada a la salida con 12bits, y una Eficiencia Cuántica (QE "Quantum Efficiency") a 670nm de cerca del 70%. De (2) podemos calcular que el fondo de

ruido que vamos a tener en nuestro sistema con tiempos de integración de 30s es de $12e^-$. Esto nos proporciona un rango dinámico máximo de 63dB.

En comparación con el CCD, la detección con tubo fotomultiplicador (PMT) puede generar hasta un millón de electrones por cada fotón incidente, sin embargo tiene una baja Eficiencia Cuántica (10%). Por otro lado el PMT tiene un mayor rango dinámico, típicamente de 4 órdenes de magnitud. Por el contrario las cámaras CCD normalmente tienen un rango dinámico aproximadamente de 3 órdenes de magnitud, valor que, como ya hemos dicho antes, es suficiente para el análisis de micro-matrices. Destacar que los PMT son caros y requieren fuentes de alto voltaje (1000VDC), no siendo adecuados para un equipo portátil. Finalmente, el muestreo de las matrices e el caso del PMT debe hacerse mediante un barrido láser de la superficie del sustrato a través de espejos electromecánicos, lo que limita la velocidad de trabajo [10]. Así pues la arquitectura más usada en el rango visible para la detección de fluorescencia está basada en matrices de fotosensores de CCD o CMOS.

En nuestro montaje, la cámara se coloca en posición vertical sobre la grabadora de CDs (Figura 2(A)), la cual ha sido modificada para dejar a la vista la parte superior del CD, lugar donde se depositan las muestras. La distancia de trabajo y el zoom de las ópticas pueden modificarse para variar el área de captura, de manera que podemos ajustar estos parámetros dependiendo del número de muestras presentes en el sustrato. Esta cámara permite controlar el tiempo de exposición desde milisegundos a minutos con el fin de incrementar la sensibilidad del sistema. Para aislar la señal emitida por el Cy5 de la señal de excitación es necesario incorporar un filtro óptico (paso banda) centrado a la longitud de onda de emisión del fluoróforo (máximo a 670nm), por tanto a la óptica de la cámara hemos añadido un filtro interferométrico (modelo XF3030 de Omega Optics). La Figura 3 muestra su respuesta espectral (respuesta del filtro F2).

D. Análisis y Almacenamiento de los Datos

Los resultados del análisis son evaluados tras la captura de la imagen. La imagen es procesada para compensar, tanto como sea posible, el ruido de fondo, la no uniformidad de la iluminación y otros defectos en la captura tales como motas de polvo. Se realiza una ecualización convencional de la imagen, y un filtrado bidireccional para aumentar la SNR. Puede conseguirse un mejora en el rango dinámico y en la SNR haciendo varias capturas de una misma imagen [11] con diferentes tiempos de exposición, donde las capturas con tiempos de exposición pequeños definirán las áreas más brillantes de la imagen final, mientras que las capturas con tiempos de exposición largos definirán las áreas más oscuras de la imagen. De esta manera se sintetiza un mayor rango dinámico.

Una vez ha sido filtrada la señal, se aplica un algoritmo de reconocimiento de formas para identificar la posición de los diferentes niveles de señal de las muestras. Se evalúa el valor medio, la desviación típica y el nivel de fondo. Esta información, junto con la imagen original y procesada, las condiciones de captura (tiempo de exposición, intensidad de iluminación, longitud de onda, temperatura, etc.) y la información administrativa relacionada se graba digitalmente en el mismo CD que se ha utilizado como

sustrato para las muestras. De esta manera conseguimos un soporte combinado de datos bioquímicos y digitales, permitiendo el almacenamiento a largo plazo y la realización de posteriores análisis sobre las mismas muestras.

Debido a la gran densidad de gotas por centímetro cuadrado y la gran superficie disponible, pueden depositarse sobre el mismo sustrato micro-matrices de diferentes análisis, permitiendo la reserva de espacio para ensayos futuros que permitan realizar un seguimiento temporal de los análisis.

III. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Para comprobar el funcionamiento del demostrado, se ha realizado un estudio comparativo mediante los resultados obtenidos con equipo comercial de lectura de micro-matrices basado en láser y PMT [12]. A fin de obtener resultados comparativos, el ensayo se analiza inicialmente con el demostrador implementado (HTS) y acto seguido se analiza con el equipo de referencia.

A fin de realizar el análisis, la superficie del CD-RW se recubre con avidina en una disolución de 100mg/l con un tampón, pH=9.6. Tras la incubación a 4°C durante toda la noche, se lava la superficie del CD con agua destilada durante un minuto. Después de esto, se depositan oligonucleótidos biotinilados con diferentes concentraciones, desde 1µM a 10 µM. Tras otro periodo de incubación (una o dos horas), el CD se lava sumergiéndolo en agua destilada antes de comenzar la fase de hibridación.

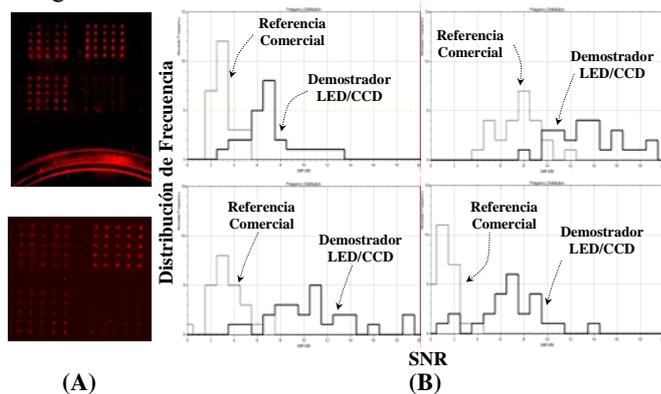


Fig. 4.- (A) SUPERIOR: Ensayo realizado sobre un CD-RW y medido con el demostrador HTS, INFERIOR: Medida realizada con el equipo comercial de referencia (B) Comparación entre distribuciones de frecuencia de SNR. Las concentraciones siguen el mismo orden que en (A).

La Figura 4 muestra los resultados obtenidos. La imagen superior de la Figura 4(A) muestra la imagen detectada con el sistema LED/CCD desarrollado, para micro-matrices hibridadas con concentraciones de 10µM, 5µM, 2µM y 1µM (Cy5 a 100nM). Como puede apreciarse existe un gradiente en el nivel de señal detectada, lo cual indica la interacción específica entre el analito marcado con Cy5 y la sonda biotinilada. La matriz de la esquina superior izquierda presenta menor intensidad debido a un excesivo lavado. La imagen inferior de la Figura 4(A) muestra el resultado obtenido sobre el mismo ensayo pero medido con el equipo comercial de referencia. En todas las pruebas realizadas el sistema LED/CCD proporciona resultados comparables a los obtenidos con el equipo de referencia.

Finalmente, en la Figura 4(B) podemos ver una distribución de frecuencia de los niveles de SNR detectados

para las diferentes concentraciones de muestras, siguiendo el mismo orden que las matrices que aparece en la Figura 4(A). Los resultados comparativos demuestran el buen funcionamiento de nuestro sistema, demostrando en este caso incluso una mayor sensibilidad.

IV. CONCLUSIONES

En este artículo describimos el análisis de alto rendimiento y bajo coste, de micro-matrices con fluorescencia (Cy5), usando como soporte medios de grabación digital convencionales. La matriz se forma mediante la impresión secuencial de muestras bioquímicas mediante inyectores de tinta convencionales sobre la superficie del CD-R/CD-RW. El sistema incluye una fuente de excitación basada en diodos emisores de luz y un detector CCD. El análisis instantáneo mediante procesamiento de la señal permite una rápida evaluación de los resultados del ensayo. Los resultados del análisis y toda la información relevante relacionada con el ensayo realizado se graba digitalmente en el mismo soporte físico en el que se han depositado los ensayos bioquímicos para su almacenamiento conjunto. El coste reducido se consigue mediante la utilización de componentes tales como LEDs (para la excitación) y una cámara CCD (para la detección) y utilizando un económico grabador de CDs comercial para el almacenamiento de los datos en la superficie del CD-R.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está subvencionado por los proyectos BIO2000-0243-P4-03 y BQU2003-02-02677

REFERENCIAS

- [1] P R Barber, B Vojnovic, G Atkin, F M Daley, S A Everett, G D Wilson and J D Gilbey "Applications of cost-effective spectral imaging microscopy in cancer research" 2003 *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 1729-1738
- [2] S.O. Van Poucke, H.J. Nelis "Rapid detection of fluorescent and chemiluminescent total coliforms and Escherichia coli on membrane filters", *Journal of Microbiological Methods* 42 (2000) 233-244
- [3] DNA Microarrays. A Practical Approach Schema, M. (Editor). Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [4] Naghi Momeni, Kumaran Ramanathan, P-O. Larsson, Bengt Danielsson, Stig Bengmark, Masoud Khayami "CCD-camera based capillary chemiluminescent detection of retinol binding protein" *Analytica Chimica Acta* 387 (1999) 21-27
- [5] Prabhavathi B Fernández "Technological advances in high-throughput screening" *Current Opinion in Chemical Biology*, Volume 2, Issue 5, 1998, Pages 597-603
- [6] Keith M. Berland "Detection of specific DNA sequences using dual-color two-photon fluorescence correlation spectroscopy" *Journal of Biotechnology* 108 (2004) 127-136
- [7] Frank V. Bright, Chase A. Munson "Time-resolved fluorescence spectroscopy for illuminating complex systems" *Analytica Chimica Acta* 500 (2003) 71-104
- [8] "L2174 Xenon Lamp", Hamamatsu Photonics, K.K., Hamamatsu City, Japan
- [9] "Retiga EXi", Qimaging Inc, Burnaby, B.C. Canada.
- [10] Van Dyke, N., Van Dyke, C., Woodfork, K., (Eds), 2002. *Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications*. CRC Press, Boca Raton/New York.
- [11] D. Yang, and A. El Gamal, "Comparative Analysis of SNR for Image Sensors with Enhanced Dynamic Range" In *Proceedings of the SPIE Electronic Imaging '99 conference*, Vol. 3649, San Jose, CA, January 1999.
- [12] "GenePix 4100A Microarray Scanner", Axon Instruments, Union City, USA