

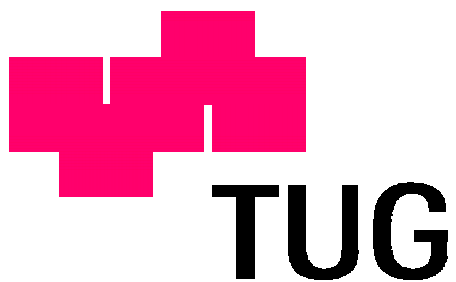
# Entwicklung und Evaluierung eines Spotters für cDNA Microarrays

**DIPLOMARBEIT**

von

Jürgen Wimmer

Technische Universität Graz  
Erzherzog-Johann-Universität



Durchgeführt am  
Institut für Elektro- und Biomedizinische Technik  
Abteilung für Biophysik  
Krenngasse 37  
8010 Graz

Institutsleiter: Univ.-Prof. Dipl. Ing. Dr. techn. Gert Pfurtscheller  
Begutachter: ao. Univ.-Prof. Dipl. Ing. Dr. techn. Zlako Trajanoski  
Betreuer: Dipl. Ing. Hubert Hackl

Graz, im Sommer 2002

## **Abstract**

Design and evaluation of a spotter for cDNA microarrays

The high density microarrays have become one of the most powerful and versatile tools for large scale gene expression analyses in the last years. For the production of spotted cDNA microarrays several devices were developed in academia and industry, but most of them are limited to this specific technology and don't provide the possibility to changeover to new evolving applications. A spotting device was developed which is able to spot cDNA slides and give the opportunities to design and develop new spotting applications.

Based on an existing prototype several modifications and improvements were carried out. To improve the speed performance new types of stepper motors and electronic controls have been installed. The spotter was supplied with a water purification system, a HEPA air filter, a housing and a vacuum pump. Additionally, a new wash and a drying station was built and the Software was optimized. The capability of the self made spotter was evaluated by means of DNA and fluorescent dyes studies.

In terms of the spot quality and functionality, the spotter accomplishes all requirements. Compared to other systems, this device is more versatile and can be used for other applications, like protein microarrays.

## Kurzfassung

Entwicklung und Evaluierung eines Spotters für DNA Microarrays

In den letzten Jahren sind High Density Microarrays eines der leistungsfähigsten und vielseitigsten Werkzeuge für Large Scale Genexpression geworden. Für die Produktion von gespotteten cDNA Microarrays sind verschiedene Geräte an der Hochschule und von der Industrie entwickelt worden, aber die meisten Geräte sind nur für diese Technologie geeignet und bieten nicht die Möglichkeit das Gerät auf neue Anwendungen umzurüsten. Ein Spotter wurde entwickelt, welcher cDNA Glasträger spotten kann und die Möglichkeit gibt, neue Spotverfahren zu entwerfen und zu entwickeln.

Basierend auf einen vorhandenen Prototyp wurden verschiedene Modifikationen und Verbesserungen durchgeführt. Um die Geschwindigkeit zu steigern, wurden neue Schrittmotoren und neue Steuerungen eingebaut. Der Spotter wurde mit einer Wasseraufbereitungsanlage, einem HEPA Luftfilter, einem Gehäuse und einer Vakuumpumpe ausgestattet. Zusätzlich wurden neue Wasch- und Trockenbecken erstellt und die Software wurde optimiert. Die Leistungsfähigkeit des Eigenbau - Spotters wurde mit gespotteten DNA und fluoreszierenden Farbstoff - Versuchen evaluiert.

Bezüglich der Spotqualität und der Funktionsfähigkeit erfüllt der Spotter alle Anforderungen. Im Vergleich mit anderen Systemen ist dieses Gerät nützlicher, weil es für andere Anwendungen, wie Protein – Microarrays, benutzt werden kann.

## Widmung

Für meine Eltern

# INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
Genexpression .....	1
Bioinformatik .....	3
Aufgabenstellung .....	7
2. METHODEN.....	8
Mechanik für XYZ Bewegung.....	8
Grundplatte .....	8
Achsen.....	9
Schrittmotoren, Elektronik.....	10
Pinhalterung, Pins.....	15
Abdeckhaube .....	16
Reinwasserherstellung.....	19
Waschen .....	25
Trocknen .....	26
PC – Programm .....	28
Steuerungsprogramm.....	35
Testreihen .....	36
Das Raster .....	36
Das Waschen und Trocknen.....	36
Der Spotdurchmesser .....	37
Die Spothomogenität .....	37
Verdünnungsreihe.....	37
3. ERGEBNISSE .....	38
Raster.....	38
Waschen und Trocknen .....	42
Spotdurchmesser .....	43
Spathomogenität .....	45
Verdünnungsreihe .....	46
4. DISSKUSION .....	47

5. LITERATURVERZEICHNIS .....	49
6. ANHANG A .....	50
SYBR Green I Protokoll zum Einfärben von DNA microarrays [2].....	50

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pin kurz nach dem Aufsetzen .....	4
Abbildung 2: Vorgang für die Herstellung eines cDNA Arrays und Hybridisierung .....	4
Abbildung 3: Schema eines Scanners für Microarrays .....	5
Abbildung 4: Auswertesoftware zum Auffinden der Spots .....	6
Abbildung 5: Grundplatte, Halterungen, Achsen.....	8
Abbildung 6: Schema für die Slidexfixierung .....	9
Abbildung 7: Drehmoment vs. Schrittfrequenz des Motors EC-Motion ECM245-1.8	10
Abbildung 8: Vergleich der Beschleunigung zwischen trapez- und rechteckförmiger Bewegung .....	12
Abbildung 9: Vergleich der Geschwindigkeit zwischen trapez- und rechteckförmiger Bewegung .....	12
Abbildung 10: Vergleich des zurückgelegten Weges zwischen trapez- und rechteckförmiger Bewegung .....	13
Abbildung 11: Drehmoment vs. Pulsfrequenz des Motors Berger – Lahr VRDM564/50LN .....	14
Abbildung 12: Schema der Bestückung des Pinhalters für 96 und 384 Wells Platten .....	15
Abbildung 13: Ansicht auf den Spotter von vorne.....	16
Abbildung 14: Prinzip der Luftfilterung im Innenraum des Spotters durch HEPA Filterung .....	17
Abbildung 15: Bedienelemente.....	19
Abbildung 16: Leitfähigkeit am Ausgang des Reinwasserfilters mit 15 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 25°C am Eingang .....	21
Abbildung 17: Wassererzeugung im Spotter .....	23
Abbildung 18: Aufbau des Waschbeckens .....	26
Abbildung 19: Schema der Trockenstation .....	27
Abbildung 20: Hauptfenster des PC-Programmes.....	28
Abbildung 21: SMS Dialog.....	30
Abbildung 22: Bewegungsparameter.....	33
Abbildung 23: Soft Touch Abstände .....	34
Abbildung 24: 600 Spots Abwechselnd CY3 und Cy5 .....	38
Abbildung 25: Abweichung der Spalte 14, 15, 16 und 17 von der Sollposition bei einer Positionierung mit der X Achse .....	39
Abbildung 26: Abweichung vom Mittelwert des Spot zu Spot Abstandes zwischen Spalte 15 und 16 .....	40
Abbildung 27: Abweichung von der Sollposition bei einer Positionierung mit der Y Achse .....	41
Abbildung 28: Pixelintensität von zehn Spalten des Glasträger mit abwechselnd gespotteten Cy3 und Cy5 Farbstoffen (Abbildung 20).....	42
Abbildung 29: GAP DH mit SYBR Green I, Stainigprotokoll, 4 Reihen a 15 Spots ...	43
Abbildung 30: Spotdurchmesser.....	44
Abbildung 31: Abweichung vom durchschnittlichen Spotdurchmesser .....	44
Abbildung 32: Darstellung von F635Median-B635 in % von F635Mean-B635, gut: Glasträger mit Gen GAP DH, schlecht: Glasträger mit grünem Farbstoff.....	45
Abbildung 33: Pixelintensität der Verdünnungsreihe .....	46

## 1. EINLEITUNG

In diesem Kapitel sind die Beweggründe für die Entwicklung eines Spotters niedergeschrieben. Ebenso, die biochemische Notwendigkeit solche Versuche und Messungen in einer Vielzahl zu machen, die Gewinnung der Rohdaten und die Weiterverarbeitung dieser.

In den letzten Jahren wurde von 30 Lebewesen das Genom vollständig sequenziert, weitere werden folgen. Diese Milliarden von DNA (Desoxy-Ribonucleinsäure) Sequenzen geben uns aber noch keinen Aufschluss darüber was die Gene machen, wie die Zellen funktionieren, wie Zellen einen Organismus formen, was bei einer Krankheit anders arbeitet, wie sie altern oder wie wir ein neues Medikament entwickeln können. Hier kommt die Bioinformatik und die Genomforschung ins Spiel. Sie soll nicht nur die Gene identifizieren, sondern auch Auskunft darüber erteilen wie und wo die Gene wirken [1].

---

### Genexpression

Um die Funktion eines Gens herauszufinden ist eine der wichtigsten Untersuchungen die Messung der Genexpression. Sie gibt Auskunft über die Anreicherung von mRNA (Messenger Ribonucleinsäure) in der Zellkernflüssigkeit [2]. Dies spiegelt die Aktivität jener Gene wieder, die zu diesem Zeitpunkt kopiert werden. Die Gesamtheit der Gene die zu einem Zeitpunkt exprimiert werden (das Transkriptom), ist eine wichtige Größe für die momentane Funktion der Zelle. Die Transkription von DNA zu mRNA ist der erste Schritt in der Proteinsynthese. Die Proteine wirken auf sehr unterschiedliche Weise im Körper. Strukturproteine ermöglichen den Aufbau von Organen, Geweben oder Haaren. Es gibt auch sehr viele funktionelle Proteine wie z.B. das Hämoglobin (Sauerstofftransport im Blut). Zu dieser

Gruppe gehören auch Enzyme und Hormone, welche viele Vorgänge im Organismus beeinflussen [3].

Die Unterschiede in der Transkription zeigen nicht nur die morphologischen Unterschiede der Zelle, sondern sind auch Antworten auf einzelne Stimuli wie die Zellteilung. Im Unterschied zum Genom ist die Genexpression sehr dynamisch. Sie verändert sich dramatisch während Störungen in der Zelle, aber auch während normaler Ereignisse, wie bei Zellteilung und DNA Replikation.

Die Frage wann, wo und aus welchen Grund ein gewisses Gen aktiv ist, ist zentral für das Verständnis der Funktion und die biologische Rolle des kodierten Proteins. Zusätzlich kann man durch die Veränderungen in Multi Gen Untersuchungen der Genexpression, Erkenntnisse über Regulationsmechanismen, komplexer Zellfunktionen und über biochemische Reaktionswege gewonnen werden. Im Zusammenhang mit der Humanmedizin können diese Messungen helfen, Ursachen und Auswirkungen einer Krankheit zu finden, wie Medikamente und deren Wirkstoffe in Zellen und Organismen wirken, und welche Gene ein Ziel für eine therapeutische Intervention sein könnten.

Eines der besten Werkzeuge die sich in den letzten Jahren entwickelt haben, sind High Density Oligonucleotid oder cDNA Microarrays. Sie arbeiten alle mit der Hybridisierung von gelabelter RNA in Verbindung mit DNA die auf einzelnen Positionen auf eine Oberfläche aufgebracht sind. Früher wurden DNA Fragmente auf eine poröse Membrane (meist Nylon) gespottet. Das Material zum Hybridisieren war oft mit einer radioaktiven Gruppe gelabelt [4]. Der Spottdurchmesser war um ein vielfaches größer. Mit dieser Technik kann man eine Anzahl von 20000 Spots – wie bei der Verwendung von Glasträger - nicht erreichen.

Die Verwendung von Glas als Träger und fluoreszierende Stoffe für die Detektion in Verbindung mit der Entwicklung von Techniken für die Positionierung von Nukleinsäuren auf Glasslides in hoher Dichte machte die Miniaturisierung möglich und steigerte die Effizienz dieser Technologie sowie deren Aussagekraft. Die Hybridisierung ist eine sehr effiziente Parallelsuche von

jedem Molekül für einen passenden Partner, die nach den molekularen Gesetzmäßigkeiten erfolgt. Damit sich cDNA an die am Slide befestigte DNA binden kann, müssen die Stränge komplementär sein. Da die Erkennung des Komplementärstranges über eine Sequenz von mehreren 1000 Nukleinsäuren erfolgt, ist diese Bindung von der cDNA (RNA) an die DNA sehr selektiv.

---

## Bioinformatik

Der erste Schritt für die Produktion eines Microarrays ist die Auswahl der Proben, die auf den Glaträger gespottet werden sollen. In den meisten Fällen werden sie direkt aus Gen-Datenbanken ( z. B. GenBank) ausgewählt. Es kann cDNA in voller Sequenzlänge oder nur teilweise sequenzierte cDNA (sogenannte expressed sequence tags (EST)) verwendet werden [5].

CDNA Arrays werden produziert in dem man PCR Produkte auf einen Glaträger in einem Raster spottet. Die Proben werden üblicherweise gereinigt um unerwünschte Salze, Detergentien, PCR-Primer und Proteine zu entfernen. Die cDNA wird in einem Buffer gelöst. Die Konzentration der Probenflüssigkeit beträgt 100-500µg/ml. Von den Proben werden kleine Mengen (<0.5nL) auf dem Träger aufgebracht. Dieser Vorgang wird von einem Roboter durchgeführt.

Bei den Spottern werden kontaktbehaftete und kontaktlose Verfahren eingesetzt. Erstere besitzen im Druckkopf einen oder mehrere Pins, die an ihrer Spitze geschlitzt sind. Dieser Schlitz bildet eine Kapillare in der sich etwa 100µL Probenflüssigkeit befinden. Diese Pins werden auf dem Glaträger abgesetzt und es wird ein kleiner Tropfen auf den Slide abgegeben. Die abgegebene Menge wird durch das Gewicht des Pins und die Geschwindigkeit des Pins beim Aufsetzen und Abheben beeinflusst.

Die kontaktlose Variante arbeitet mit Kapillaren und Piezotechnologie, um die Proben aufzutragen. Manche Geräte verwenden Druckköpfe aus Tintenstrahldruckern[6].



Abbildung 1: Pin kurz nach dem Aufsetzen

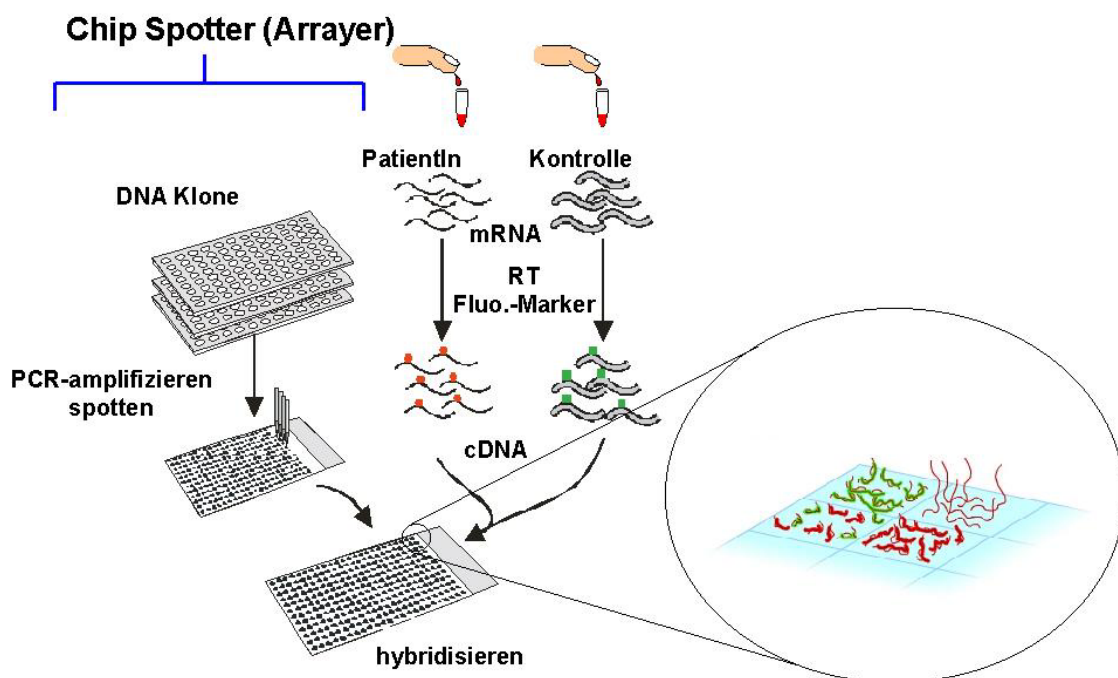


Abbildung 2: Vorgang für die Herstellung eines cDNA Arrays und Hybridisierung

Die Proben werden von einem Roboter in einem Raster auf einen Glasträger aufgetragen. Diese Glasträger sind mit Poly-Lysin, Amino-Silan oder amino reaktivem Silan beschichtet [7]. Diese Beschichtungen verbessern die

hydrophoben Eigenschaften des Glasträgers und die Adhäsion der aufgetragenen DNA. Danach wird die DNA mit ultraviolettem Licht an den Glasträger gebunden. Als nächster Schritt werden überschüssige Amine mit Succinic-anhydrid geblockt, um positive Ladungen auf der Oberfläche zu reduzieren.

Die zum Hybridisieren verwendete RNA wird aus Zellen extrahiert, in cDNA umgesetzt und anschließend gelabelt. Als fluoreszierende Labels werden meist Cy3-dUTP und Cy5-dUTP verwendet.

### Chip Scanner (Imager)

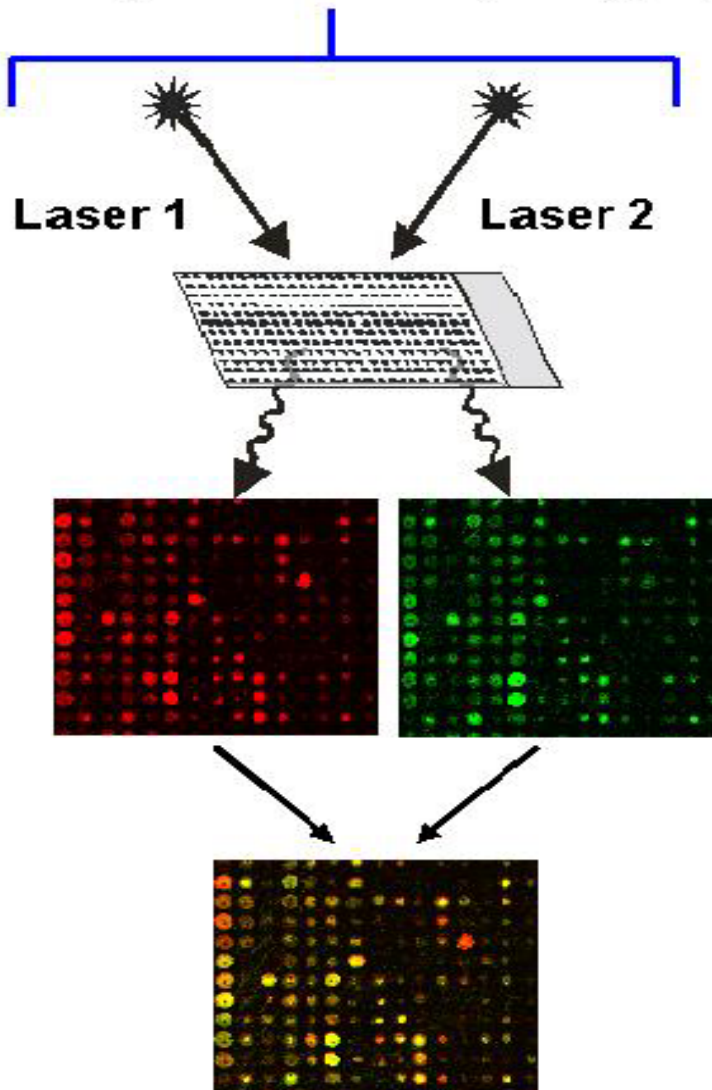


Abbildung 3: Schema eines Scanners für Microarrays

Nach dem Hybridisieren werden die cDNA Arrays gescannt. Diese Scanner arbeiten mit zwei Laser. Der eine emittiert einen Lichtstrahl mit 532nm der andere 635nm. Diese zwei Lichtstrahlen werden abwechselnd über den Glasträger geführt. Mittels eines Fotodetektors und eines Fotomultipliers wird die Fluoreszenz der hybridisierten cDNA gemessen. Diese Fluoreszenzbilder werden mit roter und grüner Farbe eingefärbt.

Konnte nur RNA mit rotem Label an die cDNA binden, entsteht ein roter Punkt im Bild. Konnte nur RNA mit grünem Label hybridisieren, entsteht ein grüner Punkt. Hybridisierten beide im gleichen Ausmaß entsteht eine Mischfarbe. Konnte weder die eine noch die andere RNA binden, wird kein farbiger Punkt dargestellt. Diese Vorgänge sind in Abbildung 3 dargestellt.

Die so entstandenen Bilder werden mit einer Analysesoftware weiterverarbeitet. Diese Softwarepakete bieten unter anderem automatisierte Funktionen für das Auffinden der Spots und für die Auswertung des Durchmessers an[8].

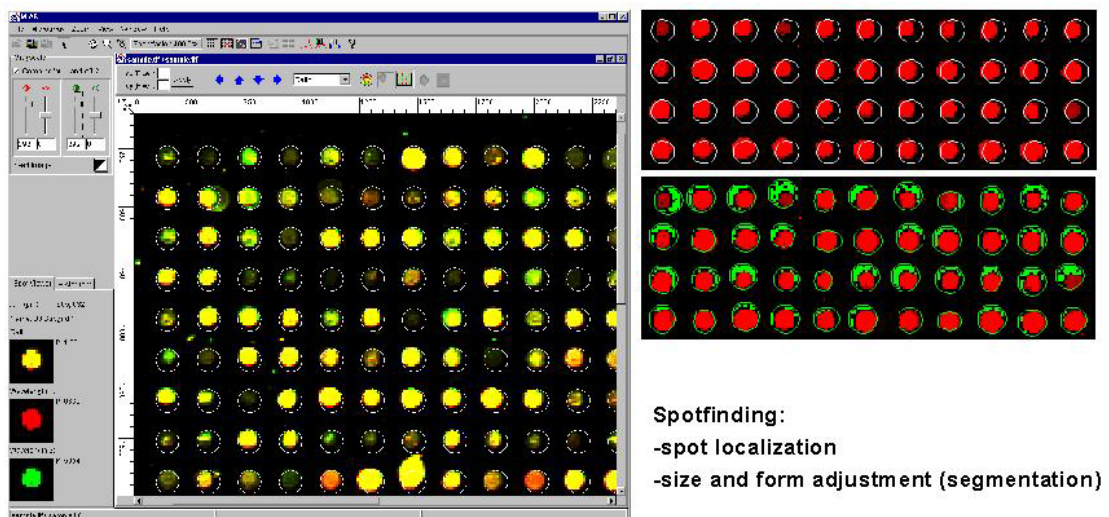


Abbildung 4: Auswertesoftware zum Auffinden der Spots

## **Aufgabenstellung**

Ein bereits bestehendes Gerät sollte modifiziert werden.

Die Ziele waren:

- Erhöhung der Bewegungsgeschwindigkeit des Roboters
- Konstruktion eines Gehäuses
- Verbesserung des Wasch- und Trockenvorganges
- Bereitstellung von Reinwasser zur Pinreinigung
- Bereitstellung von Vakuum zur Pintrocknung
- HEPA Luftfilter zur Luftreinhaltung
- Überprüfung des bestehenden PC - Steuerprogramms und aller Algorithmen
- Evaluierung des Spot zu Spot Abstandes
- Evaluierung des Wasch und Trocknungsvorganges
- Evaluierung des Spotdurchmessers
- Evaluierung der Spothomogenität
- Evaluierung einer Verdünnungsreihe

## 2. METHODEN

---

### Mechanik für XYZ Bewegung

#### Grundplatte

Am Institut für Elektro und Biomedizinische Technik an der TU - Graz wurde ein Prototyp eines Spotters entwickelt. Diese besteht aus einer massiven Grundplatte aus eloxierten Aluminium. Diese besitzt die Abmaße von 870x670x40mm und wurde weiter übernommen.

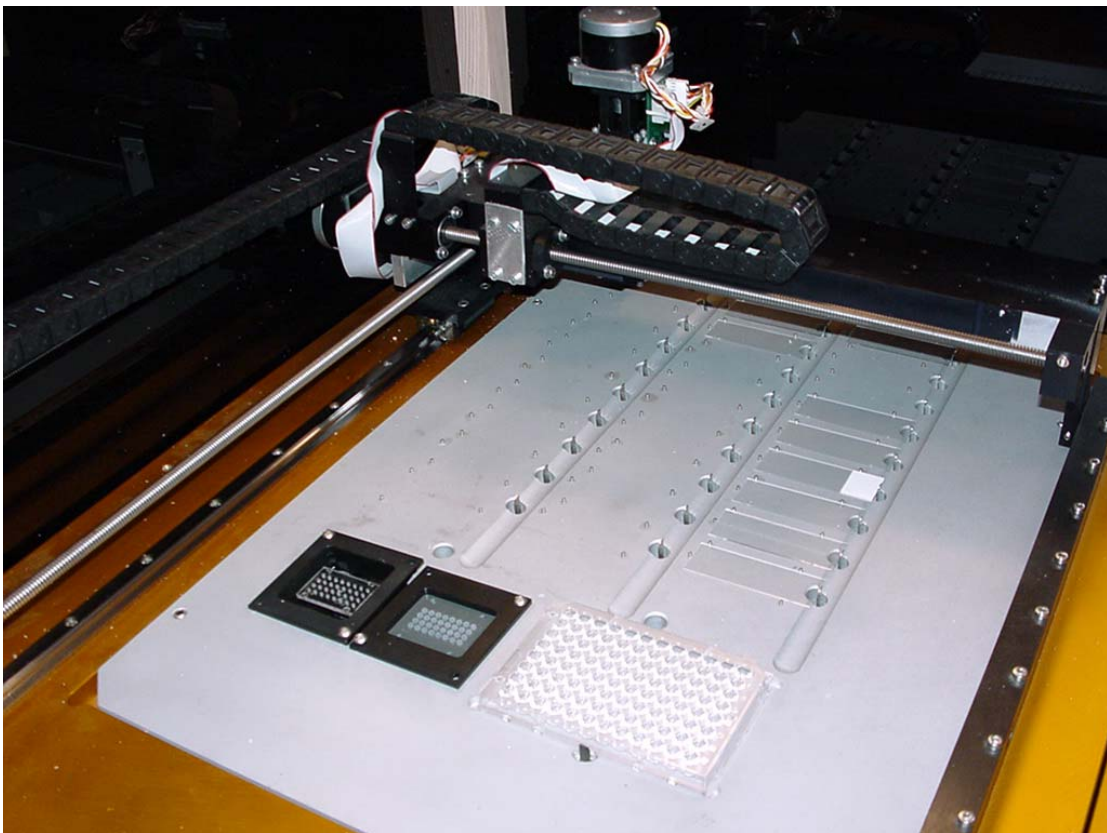


Abbildung 5: Grundplatte, Halterungen, Achsen

In dieser Platte ist einer weiter Platte eingelegt. Diese kann über mehrere Schrauben feinjustiert werden, damit sie normal (lotrecht) zu den Achsen liegt.

In diese Platte wurden Ausfräsungen für das Wasch- und Trockenbecken eingearbeitet. Für die Microtiterplatte ist eine Ausfräsung mit Federclip für sicheren Halt vorhanden. Die Slides werden durch 3 Stifte und ebenfalls einem Federclip fixiert.

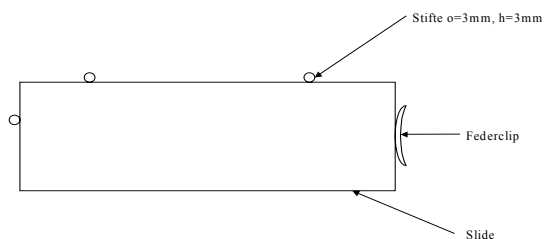


Abbildung 6: Schema für die Slidefixierung

Diese Platte bietet für 27 Glasträger Platz. Diese sind in 3 Reihen zu je 9 Stück organisiert.

### Achsen

Die Achsen bestehen aus Spindeltrieben mit Schrittmotoren. Die Achsenmechanik selbst besteht aus vorgefertigten Aluminiumprofilen. Der Gewindegangabstand der Spindeln beträgt 2mm. Bei  $1.8^\circ$  Schrittwinkel und  $0.9^\circ$  im Halbschrittmodus ergibt dies 400 Schritte pro Umdrehung. Daraus resultiert eine Auflösung von  $5\mu\text{m}$  pro Halbschritt sowie  $10\mu\text{m}$  im Vollschrift. In diesem Gerät wird der Vollschrift bei der X- und der Y Achse verwendet. Der Halbschritt bei der Z-Achse. Durch entsprechende Ansteuerung des

Schrittmotors, kann jede Position mit  $10\mu\text{m}$  Genauigkeit angefahren werden. Die Präzision hängt von der Spielfreiheit der Spindelmutter ab. Diese Muttern sind speziell für diesen Zweck gefertigt.

### Schrittmotoren, Elektronik

Als Antriebe waren Motoren der Type ECM245-1.8, EC-Motion, UK eingebaut. Das Verhalten dieses Motors ist in Abbildung 7 dargestellt. Der Schrittmotor kann von 0 bis zu einer Grenzfrequenz  $f_g$  (diese liegt bei diesem Motor bei ca. 1 kHz) annähernd das volle Drehmoment umsetzen und sinkt dann bis auf null ab. Dies entspricht einem Tiefpass 1. Ordnung.

Die Reibung der Mechanik gegenüber dem vorhandenen Drehmoment des Motors bestimmt, ob ein Schritt bei der Bewegung des Schrittmotors übersprungen wird.

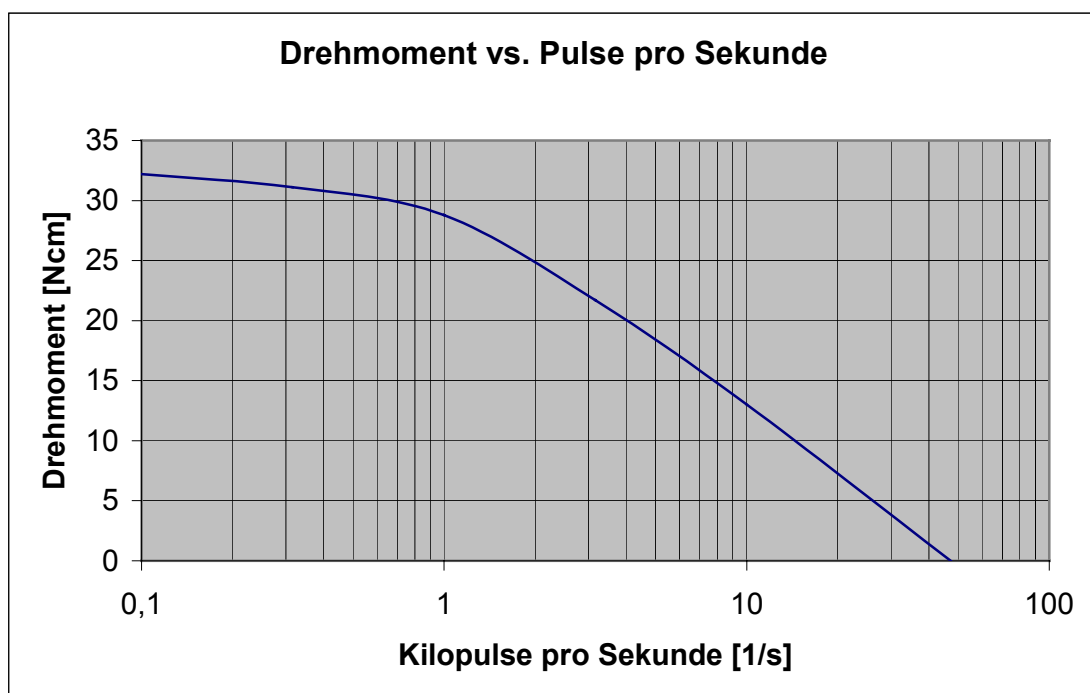


Abbildung 7: Drehmoment vs. Schrittfrequenz des Motors EC-Motion ECM245-1.8

Wenn man sofort mit einer höheren Frequenz (Rechteckform) z.B.: 10kHz startet, ist damit zu rechnen, dass der Motor angesichts des benötigten Drehmomentes für die Beschleunigung und der Haftreibung aus dem Schritt fällt und stehen bleibt oder sich erst gar nicht bewegt. Bei der Wahl der Pulsfrequenz geht man üblicherweise so vor, dass man die Frequenz steigert bis der Motor Schritte verliert und somit Fehler bei der Positionierung machen würde. Danach reduziert man die ermittelte Frequenz um 10%. Das gleiche Problem tritt in Erscheinung, wenn er die bewegte Masse nicht zu bremsen vermag.

Mit dieser Methode kann man nicht so hohe Geschwindigkeiten (Pulsfrequenzen) ansteuern und dadurch nicht die ganze Leistungsbandbreite des Motors ausnutzen, weil sie eben durch die Start- und Stoppphase begrenzt ist.

Man erzielt bessere Ergebnisse, wenn die Geschwindigkeit und somit die Pulsfrequenz, in Trapezform gesteuert wird. Den Vergleich sieht man in den folgenden Diagrammen.

In Abbildung 8 sieht man eine definierte Beschleunigung für den rechteck- und trapezförmigen Beschleunigungsverlauf. Die trapezförmige ist nur halb so groß

In Abbildung 9 erkennt man den rechteckförmigen und trapezförmigen Geschwindigkeitsverlauf. Bei der Trapezansteuerung wird zwar die maximale Geschwindigkeit später erreicht, aber sie liegt um 50% höher als beim Rechteck.

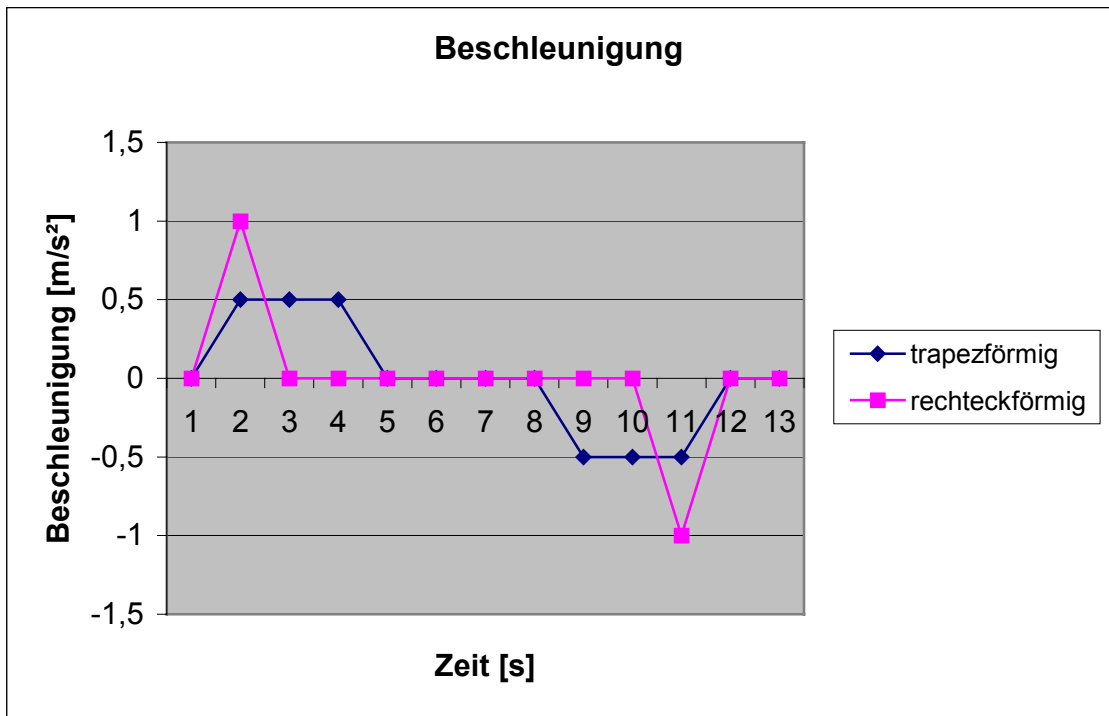


Abbildung 8: Vergleich der Beschleunigung zwischen trapez- und rechteckförmiger Bewegung

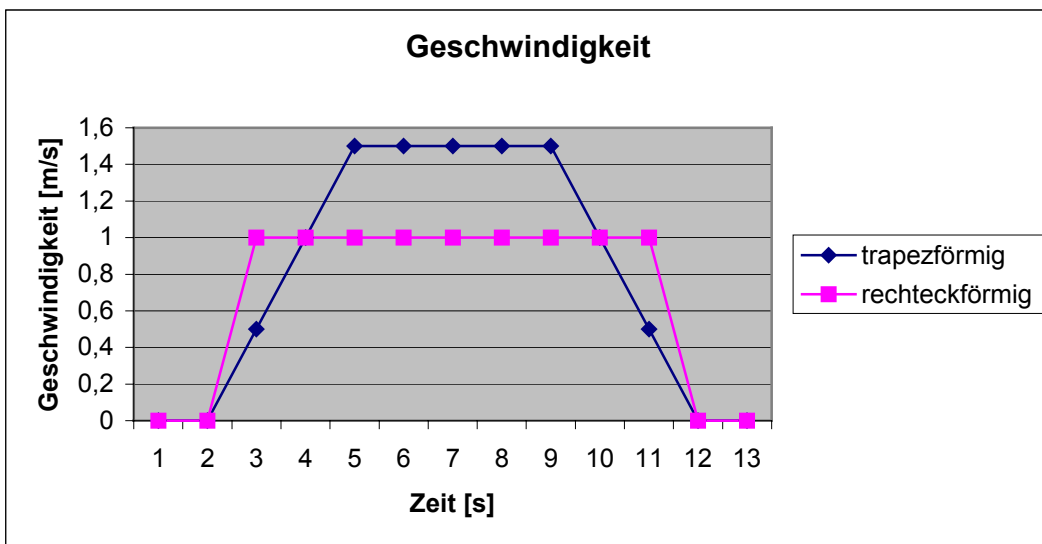


Abbildung 9: Vergleich der Geschwindigkeit zwischen trapez- und rechteckförmiger Bewegung

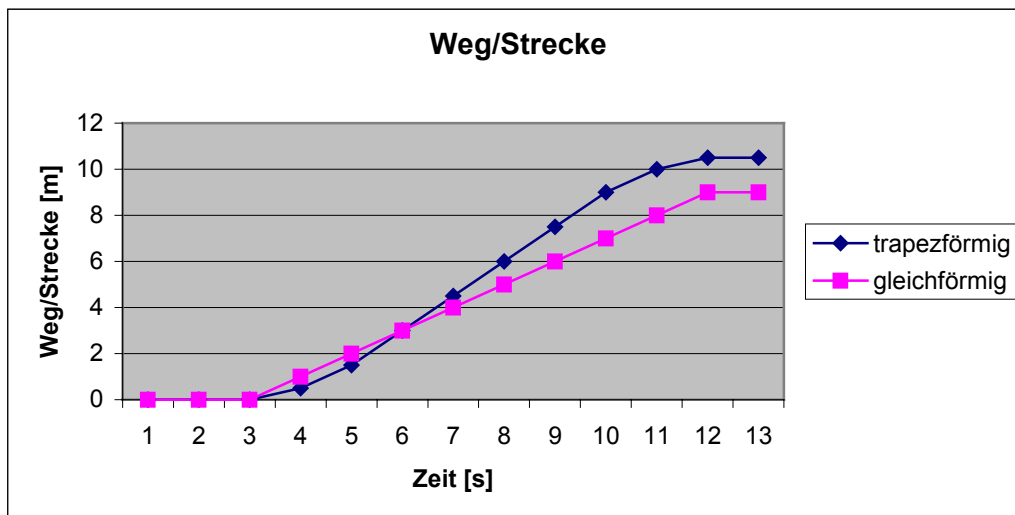


Abbildung 10: Vergleich des zurückgelegten Weges zwischen trapez- und rechteckförmiger Bewegung

Wie in Abbildung 8,9 und 10 zu sehen ist kann durch die trapezförmige Ansteuerung bei nur halb so großer Beschleunigung eine höhere Geschwindigkeit erreicht werden. Trotz der anfänglich niedrigeren Geschwindigkeit wird in Summe eine größere Wegstrecke zurückgelegt.

Die jetzige Ansteuerung arbeitet im Vollschrittmodus mit 4kHz maximaler Pulsfrequenz. Bei einem Schrittwinkel von  $1.8^\circ$  also 200 Pulse pro Umdrehung entspricht dies 10 Umdrehungen pro Sekunde. Mit einem Spindelgang von 2mm ergibt dies eine Geschwindigkeit von 2cm/s.

Für die Spotform sind vor allem die Aufsetzdauer und die Abhebgeschwindigkeit entscheidend. Die vorhandene Elektronik wurde von einem anderen Gerät adaptiert und lies somit die Einstellung dieser Parameter nicht in den gewünschten Größen zu.

Aus diesem Grunde wurden alle Motoren sowie die Ansteuerelektronik durch ein neues System ersetzt. Dieses besteht aus einem Berger - Lahr Fünfphasen Schrittmotor, einer Ansteuerkarte Berger - Lahr D230.00/01 (Eckdaten im Anhang) und einer Kompaktsteuerung der Fa. RESI Type: RESI M-U.

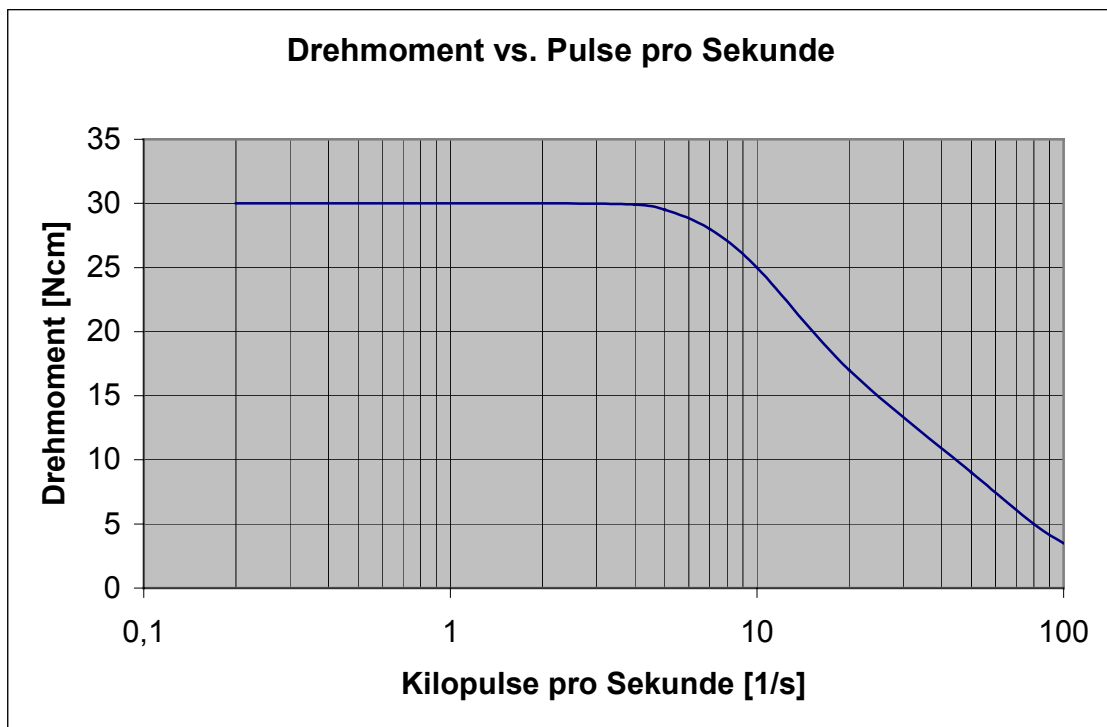


Abbildung 11: Drehmoment vs. Pulsfrequenz des Motors Berger – Lahr VRDM564/50LN

Der neue Motor besitzt eine höhere Grenzfrequenz für den Drehmomentabfall. Diese liegt um ca. Faktor 5 höher. Jedoch beträgt der Schrittwinkel durch den fünfphasigen Motor nur mehr  $0.72^\circ$ , das heißt, es müssen jetzt 5 Schritte im Halbschrittmodus ( $0.36^\circ$ ) gemacht werden, um den selben Schrittwinkel von  $1.8^\circ$  zu erreichen. Bei einer maximalen Pulsfrequenz der Karte von 20kHz, ergibt dies maximal 40 Umdrehungen pro Sekunde und 8cm/s. Somit wurde die Geschwindigkeit um den Faktor 4 gesteigert.

Durch diese Geschwindigkeitserhöhung konnte die Zeit für einen Spott auf dem weitest entfernten Slide von ca. 45sec auf 35sec gesenkt werden. Die Hauptzeit entfällt weiterhin auf das Waschen, die Trocknung und auf die Probenaufnahme. Die Zeit zum Spotten von 3000 Punkten auf einem Slide war (ohne Wechsel der Microtiterplatten) 37.5 h. Mit den neuen Motoren beträgt nun diese Zeit 29.16 h. Die Microtiterplatten müssen alle 3.38h ausgetauscht werden.

Bei Verwendung dieser Motoren, ist im Halbschrittmodus von  $0.36^\circ$  eine theoretische Auflösung von  $2\mu\text{m}$  möglich, welche bei einem Spottdurchmesser im Bereich von  $100\text{-}150\mu\text{m}$  nicht erforderlich ist, da die Variabilität im Durchmesser weit größer als die Positionierungsgenauigkeit wäre.

### Pinhalterung, Pins

Der bereits vorhanden Arraylt Stealth-Printkopf von der Fa. TeleChem, Sunnyvale, CA, USA wurde weiter verwendet. Er bietet Platz für 32 Pins. Diese sind in einem Abstand von  $4.5\text{mm}$  angeordnet, sodass wenn jeweils ein Loch ausgelassen wird die Pins genau in eine 96 Wells Titerplatte und wenn man jede Bohrung bestückt in eine 384 Wells Microtiterplatte passen.

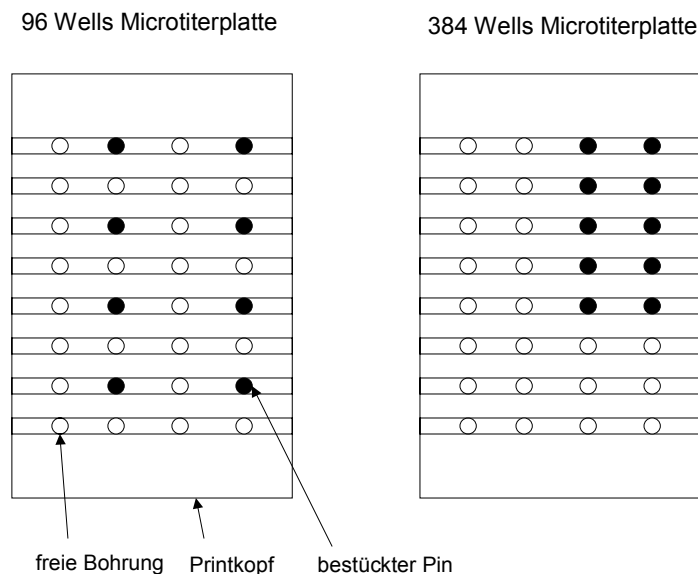


Abbildung 12: Schema der Bestückung des Pinhalters für 96 und 384 Wells Platten

Dadurch kann eine 384 Well Microtiterplatte genau so schnell gespottet werden wie eine 96 Well Platte.

### **Abdeckhaube**

Als Gehäuse wurde eine Konstruktion aus schwarzen Plexiglasplatten gewählt. Dieses beinhaltet sowohl den Spotter, das 3-Achsendgestell, sowie die notwendige Infrastruktur (Wasser, Vakuum, Pumpe, etc.). Als Verbindungsmaterial wurde Aluminium verwendet.

Die Abmessungen entsprechen in etwa 950x870x600mm. Das Gesamtgewicht beträgt ca. 100kg geschätzt.



Abbildung 13: Ansicht auf den Spotter von vorne

Zusätzlich wurde ein sogenanntes HEPA – Filter (Pall Austria Filter GmbH, Wien, Österreich) eingebaut. Dieses besteht aus einem Radialgebläse und einem 0.3 $\mu$ m Feinstaubfilter. Es bläst mit Überdruck gereinigte Luft in das

Gehäuse. Dadurch kann über die Vakuumpumpe der Trocknungsstation keine verstaubte Luft durch die Ritzen des Gehäuses angesaugt werden.

Mit diesem Filter soll verhindert werden, dass die Slides bei ihrem Verbleib von 2 – 4 Tagen im Spotter zu sehr verstauben. Die Staubkörner sind in der Regel größer als die Spots. Sie würden somit mehrere Spots überdecken. In weiterer Folge wird die automatische Rastererkennung durch die nachfolgende Auswertesoftware erschwert.

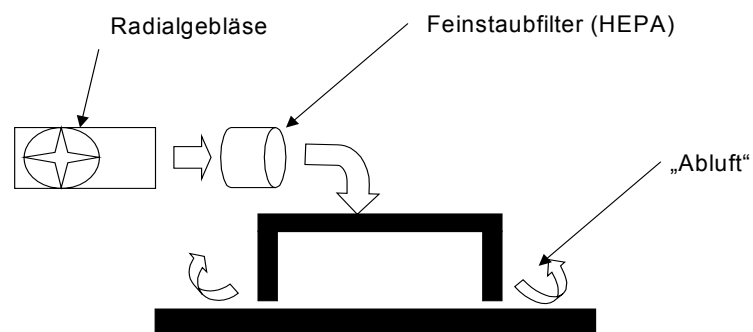


Abbildung 14: Prinzip der Luftfilterung im Innenraum des Spotters durch HEPA Filterung

Durch den Überdruck, das das Radialgebläse erzeugt, wird verhindert, dass verstaubte Luft eindringen kann.

An der Seite des Gehäuses wurden Bedienelemente und Warnleuchten installiert. Diese sind:

- Ablasshahn für das Reinwasser, da es auch für andere Zwecke verwendet werden kann.
- Schalter für Reinwassererzeugung ohne Spotteraktivierung
- Schalter für Vakuumerzeugung ohne Spotteraktivierung
- Taster für die Quittierung von gemeldeten Fehlern
- Leuchte für die Wassererzeugung
- Leuchte für die Vakuumerzeugung
- Leuchte für Abwasserüberlauf
- Leuchte für Reinwasserüberlauf
- Leuchte für fehlendes Reinwasser (Filterverstopfung)

Zusätzlich sind natürlich Kaltgerätebuchse, Netzschalter und 9 polige Sub-D Buchse für die serielle Ankopplung vorhanden.



Abbildung 15: Bedienelemente

---

## Reinwasserherstellung

Die Erzeugung des Reinwassers erfolgt in drei Stufen.

### **Filterstufe 1:**

Das erste Filter ist ein Grobfilter, das Sand und andere größere Partikel zurückhalten soll. Dieses Filter beinhaltet auch eine Kammer mit Aktivkohle das Chlor und Medikamentenbestandteile und ähnliche chemische Substanzen aufnehmen soll.

### **Filterstufe 2:**

Das nächste Element ist eine Umkehrosmosemembran. Diese kann bei einem Differenzdruck von 4bar 90 Liter Osmosewasser pro Tag erzeugen. Diese Filterung reduziert die Leitfähigkeit von angenommenen 750  $\mu\text{S}/\text{cm}$  des Leitungswassers in Graz auf ca. 15 – 20  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Die Literleistung wird durch das Alter der Membran bestimmt. Ein weiterer Faktor ist, dass die Membrane bei nicht regelmäßiger Spülung verschmutzt oder verlegt sein kann. Auch die Temperatur des Wassers beeinflusst, die Menge des gewonnenen Wassers (je geringer die Temperatur desto geringer der Durchsatz durch die Membrane). Dies hat zur Folge, dass im Winter um ca. 10% weniger Reinwasser gewonnen werden kann. Die Membran muss nach einer Gewinnung von ca. 10000l Reinwasser getauscht werden.

Die Membran muss regelmäßig gereinigt werden. Dazu spült man das Filter mit Wasser die zurückgehaltenen Bestandteile von der Kunststoffolie weg. Dies geschieht bei der Inbetriebnahme und beim Abstellen des Gerätes jeweils für 5 Minuten. Zusätzlich wird jede Stunde für 30 Sekunden gespült.

Die Rückerhaltrate beträgt 1:3. Das heißt, dass für 1Liter Osmosewasser 3Liter Abwasser entstehen. Bei 90Liter Osmosewasser pro Tag werden somit 360Liter Trinkwasser benötigt.

### **Filterstufe 3:**

Das nächste Filter beinhaltet Kügelchen aus Kieselsäureharz. Diese bestehen aus einem Mischbett mit stark basischen und stark sauren Elementen (Ionenaustauscher). Das Harz tauscht alle positiven Salzteilechen (Kationen) gegen  $\text{H}^+$  und alle negativen Ionen gegen  $\text{OH}^-$  aus. Die beiden ausgetauschten Ionen  $\text{H}^+$  und  $\text{OH}^-$  verbinden sich zu neutralem Wasser  $\text{H}_2\text{O}$ . Es sind anschließend weit über 99% aller gelösten Salzteile einschließlich der Kieselsäure entfernt oder gebunden.

Das Harz kann nur eine begrenzte Menge an Ionen aufnehmen und muss anschließend ausgetauscht werden. Die erzeugbare Menge an Reinwasser hängt von der Qualität des Eingangswassers ab (siehe Tabelle1).

Eingangseleitfähigkeit [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ]	10	15	20	25	30	35	40	50
Kapazität [L]	1500	1000	750	600	500	430	380	300

Tabelle 1: Reinwasserfilter Kapazität in Abhängigkeit der Eingangseleitfähigkeit

Wenn die Leitfähigkeit des gefilterten Wassers über  $0.3 \mu\text{S}/\text{cm}$  liegt funktioniert der Ionenaustausch im Harz nicht mehr. Die Leitfähigkeit steigt anschließend rasch auf den Wert vor dem Ionenaustauscher oder eben nach dem Osmosefilter das sind ca.  $15 - 20 \mu\text{S}/\text{cm}$  an.

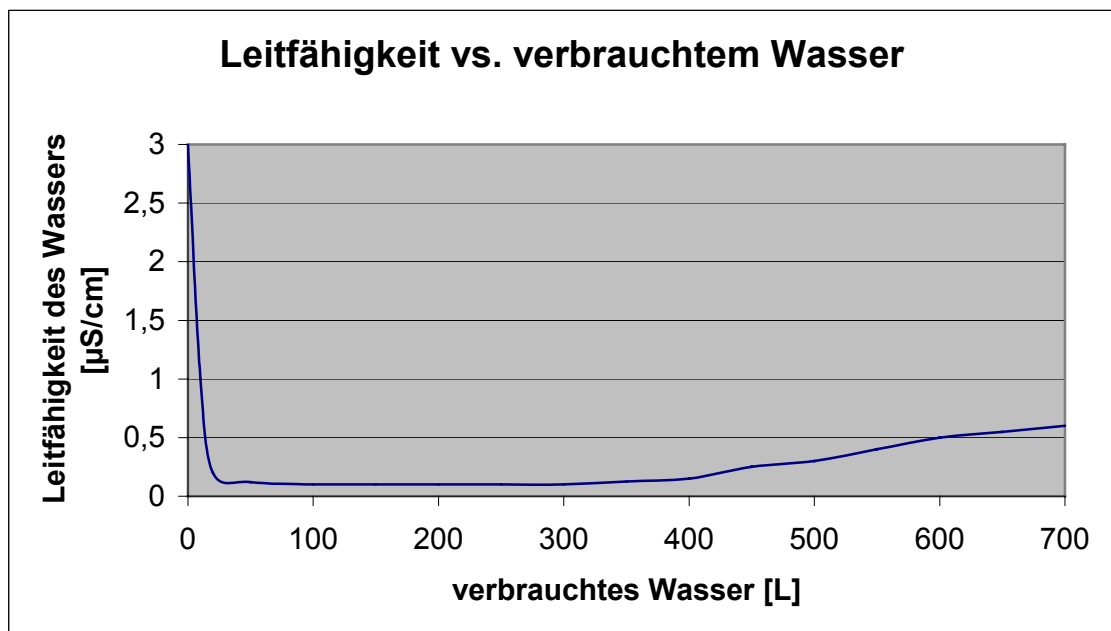


Abbildung 16: Leitfähigkeit am Ausgang des Reinwasserfilters mit  $15 \mu\text{S}/\text{cm}$   $25^\circ\text{C}$  am Eingang

Wie in Abbildung 12 ersichtlich ist, kann man bei der angenommenen Eingangseleitfähigkeit in etwa 600l mit einem Wert kleiner als  $0.5 \mu\text{S}/\text{cm}$  erzeugen.

Das erzeugte Reinwasser wird in einem 12 Liter Tank gesammelt und steht dem Spotter zur Verfügung. Es besteht zusätzlich die Möglichkeit Reinwasser

an einem Zapfhahn zu entnehmen, um andere Laborgeräte mit Reinwasser zu versorgen oder um diese zu reinigen.

Das „Abwasser“ entsteht beim Spotter selbst und bei der Osmosemembrane einerseits dadurch, dass nur ein Drittel des zugeführten Wassers zu Reinwasser wird (Rückerhaltrate 1:3) und andererseits durch die Spülvorgänge in der Membrane. Dieses Wasser wird in einem 20 Liter Behälter gesammelt den man einfach unter dem Tisch des Spotters stellt. Wenn er voll ist wird er automatisch abgepumpt.

Die Steuerung der Anlage wird durch eine kleine SPS (frei programmierbare Steuerung) erledigt. Mit dieser Elektronik werden die Leuchten, Schalter, Schwimmschalter und Magnetventile sowie die Vakuumpumpe angesteuert. Das in der Steuerung befindliche Programm wurde in der Programmiersprache C erstellt.

Sie übernimmt auch die zeitliche Steuerung des Ablaufes z.B., wie oben erwähnt, die stündliche Spülung der Osmosemembrane. Falls Fehlermeldungen entstehen, werden diese an die zweite Steuerung (die den Spotvorgang steuert) weitergeleitet, da diese in Verbindung mit dem PC steht.

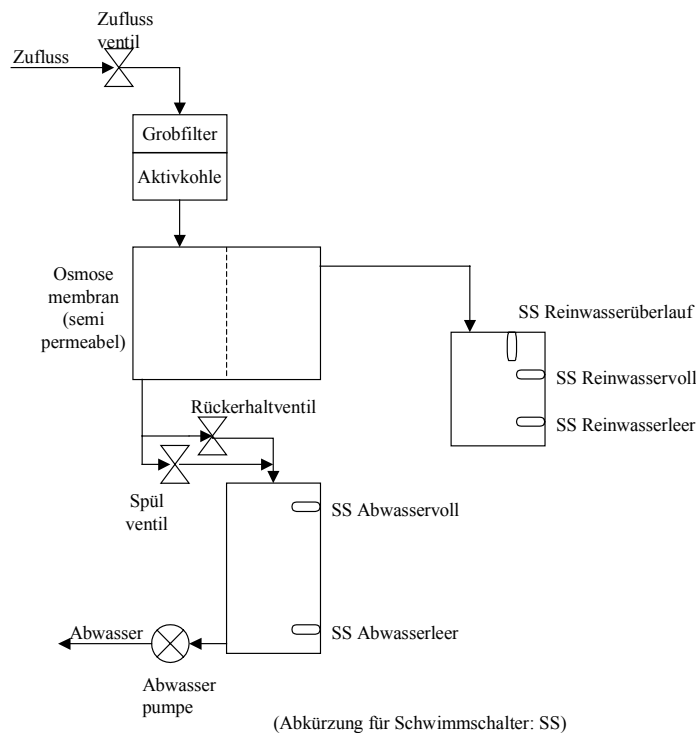


Abbildung 17: Wassererzeugung im Spotter

Das Zuflussventil wird durch den Schalter Wassererzeugung oder durch ein Signal von der Motorsteuerung (Spotter aktiv) aktiviert.

Das Rückhaltventil wird fix auf eine Rückhaltrate von ca. 1:3 eingestellt.

Das Spülventil wird jede Stunde und beim An- und Ausschalten aktiviert.

Mit den Schwimmschaltern können folgende Betriebs- und Fehlerfälle erkannt werden:

„Abwasser leer“ wird benötigt, da die verwendete Pumpe nicht selbstansaugend ist, daher ist ein Mindestpegel an Wasser notwendig, damit die Pumpe keine Luft ansaugt. Dieser Pegelschalter ist in ca. 5cm Wasserhöhe montiert.

„Abwasser voll“ zeigt an, dass der Abwasserkanister zu 90% voll ist. Die Pumpe wird aktiviert. Nach ca. 60sec muss der Schwimmerschalter „Abwasser voll“ abfallen, nach 5min der Schalter „Abwasser leer“ jedoch spätestens nach 15min

(maximale Pumpenlaufzeit). Diese Doppelabfrage (5min, 15min) ist notwendig da in der Zeit wo die Osmosemembrane gespült wird, der Zufluss sehr hoch ist. Sollte dies nicht der Fall sein, wird die Fehlermeldung „Abwasserüberlauf“ eingeschalten. Die Pumpe stoppt, das Zuflussventil wird geschlossen, der Spotter beendet den begonnenen Spotvorgang und stellt ebenfalls seine Arbeit ein.

Die für den Waschvorgang verwendete Pumpe ist nicht selbstansaugend. Der Pegelschalter „Reinwasser leer“ wurde deshalb in einer Höhe von 2 cm montiert. Dadurch wurde gewährleistet das keine Luft angesaugt wurde. Da der Reinwassertank bei der ersten Inbetriebnahme oder nach einer völligen Entleerung leer ist, muss der Pegelschalter „Reinwasser leer“ nach 20min überschritten werden. Ansonsten ist der Spotter möglicherweise nicht an der Wasserleitung angeschlossen oder ein anderer Fehlerfall ist aufgetreten. Ist Wasser im Reinwassertank vorhanden und dieser Pegelschalter wird unterschritten wird ebenfalls kein Reinwasser produziert, daher der Spotter ist nicht an die Wasserversorgung angeschlossen, ein Filter ist verstopft oder ähnliches. In dieser Zeit darf nicht gespottet werden, da der korrekte Waschvorgang nicht garantiert werden kann. Fehlermeldung „kein Reinwasser“ wird eingeschalten.

Ist der Schalter „Reinwasser voll“ erreicht wird das Zuflussventil ausgeschalten. Erreicht das Wasser darauffolgend den Schalter „Reinwasser Überlauf“ dennoch, muss angenommen werden, dass das Zuflussventil defekt ist. Fehlermeldung: „Reinwasser Überlauf“ wird eingeschalten.

Diese Fehlermeldungen werden vom PC über die Motorsteuerung zyklisch ausgelesen und können falls aktiviert als E-Mail oder als SMS gesendet werden. Dazu mehr im Kapitel PC-Programm

### Waschen

Bis jetzt wurde für den Waschvorgang mittels einer kleinen Pumpe destilliertes Wasser aus einem externen Kanister entnommen. Um den Waschvorgang zu verbessern, wurden im Waschprozess und der Waschstation Änderungen vorgenommen.

Ein mögliches Prinzip zur Verbesserung des Waschprozesses – wie von anderen Herstellern bereits implementiert- wäre einen Ultraschallgeber in das Becken zu installieren, um eine bessere Bewegung des Wassers am Pin zu erreichen. Das Ziel war diese Bewegung mit dem Wasser selbst zu erreichen. Dazu wurde eine Pumpe, die einen Druck von ca. 1bar erzeugt, in Kombination mit einem Ventil, das im 0.5sec Takt ein- und abschaltet. Dadurch konnte man das vorhandene Becken weiterverwenden. Zusätzlich wurde das Waschbecken modifiziert, sodass das jeder Pin einen eigenen Wasserstrahl bekommt (wie ein Brausekopf).

Durch dieses Vorgehen entsteht eine stationäre Wasserschicht über der Brauseplatte. Im 0.5sec Takt spritzt ein Wasserstrahl über den Pin.

Durch den Überdruck vor dem „Brausesieb“ können Totwasserzonen verhindert werden, und jeder Pin wird mit annähernd der selben Wassermenge gewaschen und umspült.

Durch die Pause im Waschzyklus kann das verschmutzte Wasser abfließen. Beim nächsten aktivieren des Pulsventils spritzt wieder frisches Wasser auf die Pins.

Durch dieses Vorgehen konnte der Waschvorgang verbessert und dadurch die Waschzeit verringert werden (es werden weniger Waschzyklen und weniger Reinwasser benötigt). Zusätzlich wird durch das Taktverhältnis von 50% die benötigte Wassermenge nochmals halbiert.

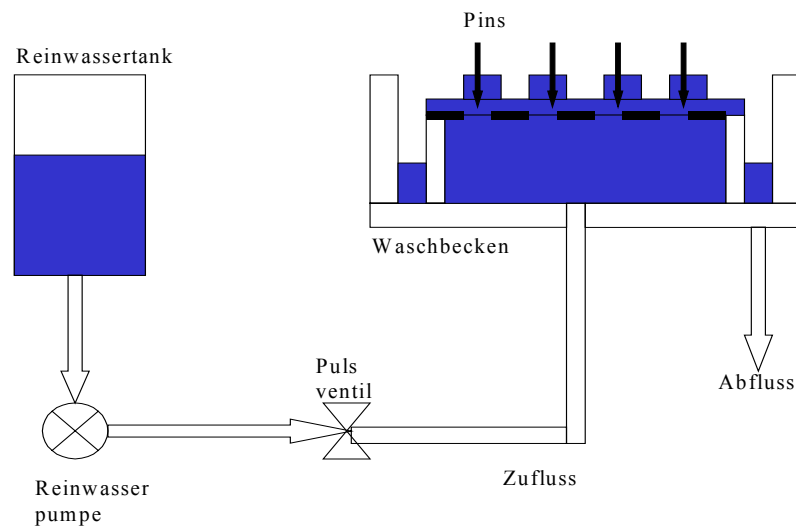


Abbildung 18: Aufbau des Waschbeckens

---

## Trocknen

Das Trockenbecken besteht aus einer Plastikplatte in die 32 Röhrrchen eingeklebt sind. Diese Röhrrchen ragen in ein Verteilervolumen an das eine Vakuumpumpe angeschlossen wurde.

Durch vergrößern des Volumens hinter den Röhrrchen konnte eine bessere Verteilung der Luftmenge an den einzelnen Löchern erreicht werden. Auch ein Vergrößern des Anschlussrohres verringert den Luftwiderstand im Ansaugweg. Damit entsteht der größte Druckunterschied ( also der größte Luftwiderstand) an den Röhrrchen selbst. Dies verhindert, dass einiges der Pumpleistung am Weg zur Trockenstation verbraucht wird.

Zuerst wurde ein Vakuumpumpe mit  $4\text{m}^3/\text{h}$  verwendet. Diese Pumpe war eine Drehschieberpumpe. Dieses Arbeitsprinzip bringt zwar ein großes Endvakuum jedoch kann nur relativ geringe Luftmengen fördern.

Jetzt wird ein zweistufiger Seitenkanalverdichter verwendet der  $75\text{m}^3/\text{h}$  leistet. Dieses Arbeitsprinzip verwendet einen Radialverdichter, der zwar nur ein geringes Differenzvakuum erreicht, aber im Vergleich zur Baugröße sehr große Luftmengen fördern kann.

Es ist anzunehmen, dass nicht die ganzen  $75\text{m}^3/\text{h}$  durch die Röhrchen fließen, jedoch wurde mit mindestens  $10\text{m}^3/\text{h}$  gerechnet.

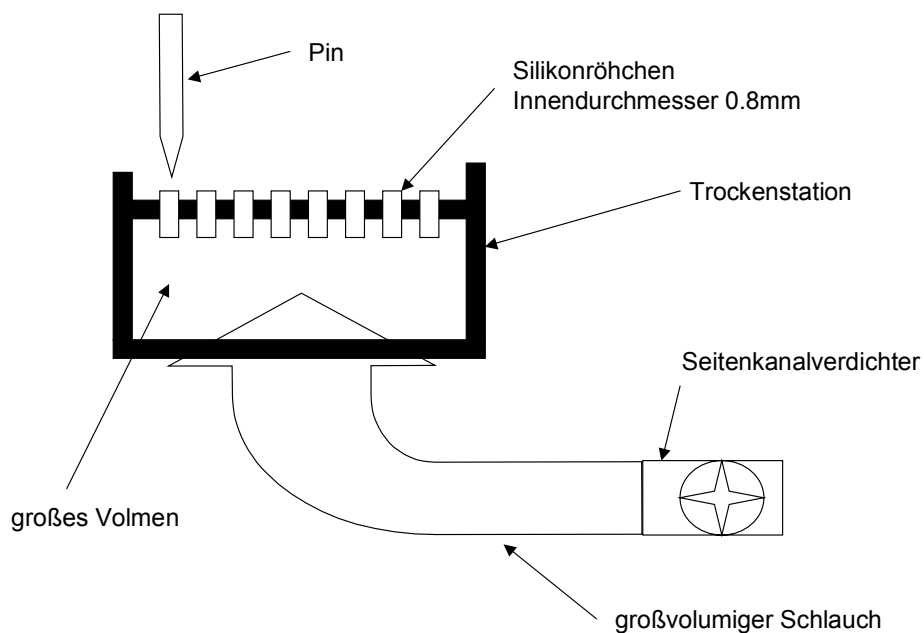


Abbildung 19: Schema der Trockenstation

## PC – Programm

Das PC Programm wurde weitgehend übernommen worden. Das Hauptfenster sieht wie folgt aus:

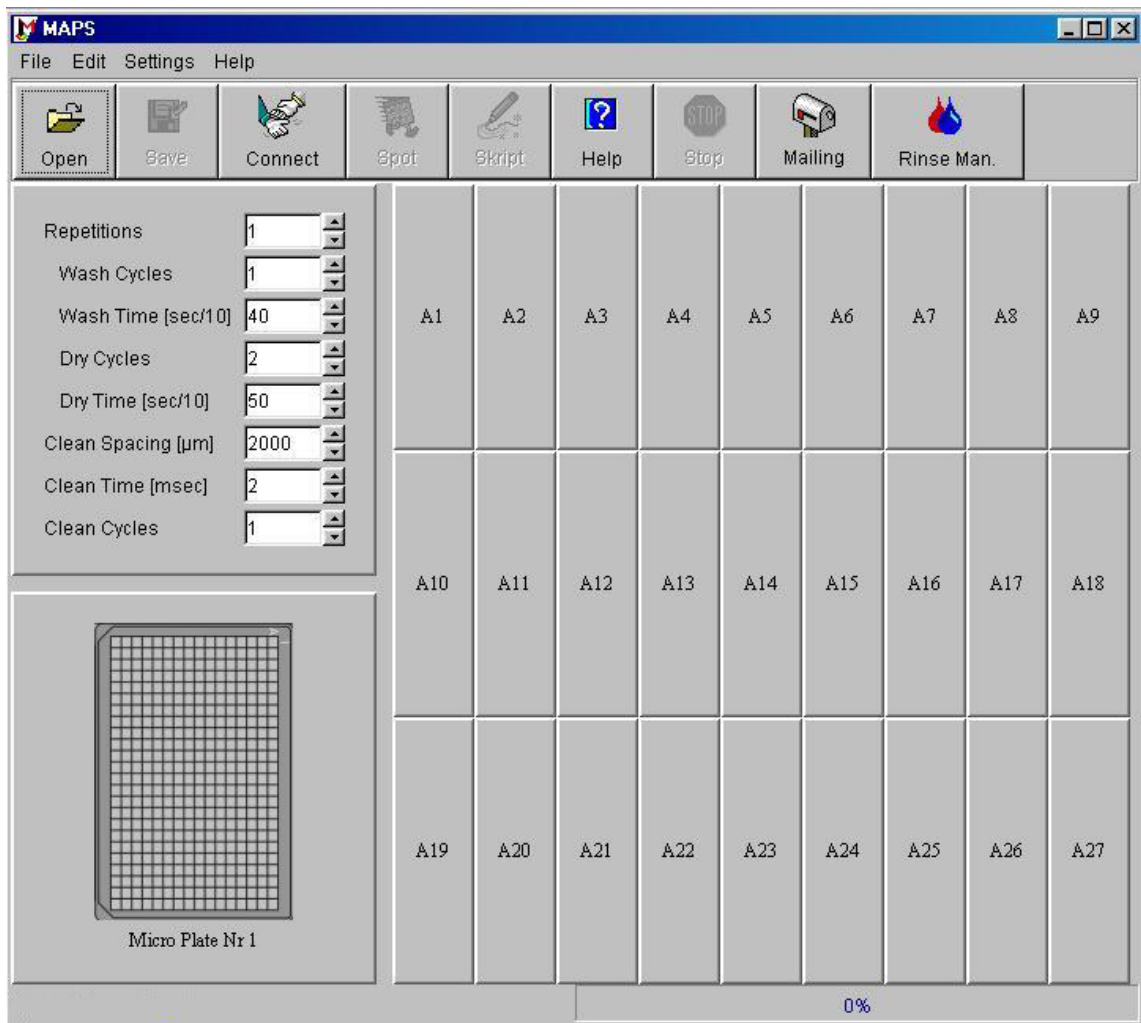


Abbildung 20: Hauptfenster des PC-Programmes

Die Funktionen gliedern sich in

### **Buttons:**

- **Open:** Hier kann eine abgespeicherte Spottingssession geladen werden, um sie nochmals auszuführen. Auch wenn ein Spottvorgang abgebrochen wird, kann der noch zu spottende Rest abgespeichert werden und mit diesem Button zur Fertigstellung geladen werden.
- **Save:** Hier kann man Spottvorgänge offline berechnen lassen und abspeichern.
- **Connect:** Mit diesem Button wird die Verbindung zum Gerät hergestellt.
- **Spot:** Der Spottvorgang wird gestartet.
- **Skript:** Hier können die einzelnen Bewegungsabläufe (Spot, Dry, Wash, usw.) beobachtet und kontrolliert werden.
- **Help:** Die Hilfedatei wird gestartet.
- **Stop:** Ein laufender Spottvorgang wird unterbrochen.
- **Mailing:** Der Mailingdialog wird gestartet. Mit dieser Funktion können Status- und Fehlermeldungen per e-Mail an einen anderen e-Mail Empfänger oder an ein Handy als SMS gesendet werden.

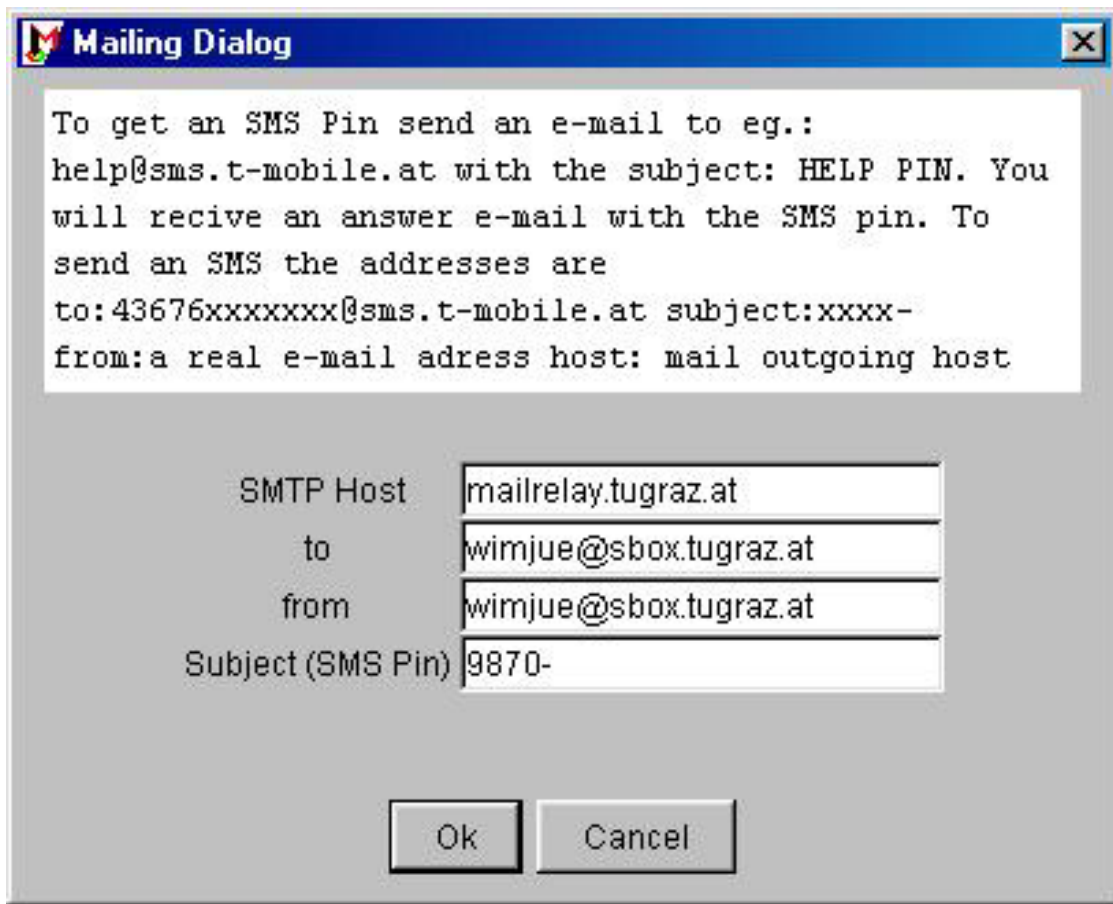


Abbildung 21: SMS Dialog

Zu diesem Zwecke müssen der Host der Mailverbindung und der Empfänger eingetragen werden. Die „from“ Adresse muss eine gültige e-Mail Adresse sein. Als Subject kann bei einem e-Mail etwas beliebiges stehen, jedoch wenn man die Botschaft an ein Handy schicken möchte, muss der SMS Pin eingetragen werden.

Diesen SMS Pin bekommt man, indem man z.B.: an [help@sms.t-mobile.at](mailto:help@sms.t-mobile.at) eine Mail schreibt und das Subject „HELP PIN“ verwendet. Nach einiger Zeit bekommt man ein Antwortmail mit dem PIN-Code. Wenn man innerhalb von 24h ein Mail mit diesem Pin verschickt wird, ist er für weitere 60 Tage gültig, ansonsten verfällt er wieder. Nach den 60 Tagen muss man sich einen neuen Pin holen. Dieser Dienst wird auch von A1 angeboten und funktioniert ähnlich, nur bekommt man den Pin als SMS an das Handy geschickt. Die Netzanbieter ONE und TeleRing bieten diesen Service nicht an.

- Rinse: Hier kann die Waschpumpe aktiviert werden, um zu kontrollieren, ob Wasser vorhanden ist und wenn ja kann der verbleibende Rest in der Leitung abgelassen werden.

### **Wash Dry Clean Parameter:**

- Repetition: Anzahl der Wiederholungen für Waschen und Trocknen gesamt.
- Wash Cycles: Anzahl der Waschvorgänge innerhalb einer Repetition.
- Wash Time: Zeit die der Pin im Wasser gewaschen wird.
- Dry Cycles: Anzahl der Trocknungsvorgänge innerhalb einer Repetition.
- Dry Time: Dauer des Trocknungsvorganges.

Nach der Entnahme der Probe aus der Microtiterplatte, besteht die Möglichkeit, dass an der Außenseite des Pins Probenflüssigkeit haftet. Diese löst sich während der ersten Kontakte mit dem Slide. Als Ergebnis hätte man einen großen Spot. Um dies zu verhindern kann man ein sogenanntes Prespotting oder Cleaning definieren. Wir verwenden dazu ein sehr saugfähiges Filterpapier (Hybond N, Amersham, UK). Zu beachten war, dass die Probe auf dem Papier sehr stark verrinnt und somit ein großer Abstand bei den Spotts zu wählen ist (2000 $\mu$ m). Würde der Pin auf eine alte Probe aufsetzen, kann man mit einem Übersprechen von Probe zu Probe rechnen.

- Clean Spacing: Abstand der Spotts beim „Cleanen“.
- Clean Time: Zeit des Pins auf dem Papier.
- Clean Cycles: Anzahl der Prespots.

### **Slide parameter:**

- Slide Typ: In der Datei "Slides.dat" können verschiedene Slide Typen definiert werden. Zu diesem Zwecke definiert man einen Namen, eine Artikelnummer, die Länge X, die Breite Y und den Einrückungsabstand von oben, unten, links und rechts. Alle Maße in Millimeter.
- Spot to Spot Abstand: in  $\mu\text{m}$ .
- Spots per Pin: wie viele Spots werden pro Pin gemacht. Eigentlich nur von Interesse wenn man mehrere Pin verwendet. Dadurch ergibt die Größe des Subgrids.
- Replications: wie oft soll eine Probe gespottet werden.
- Top Margin: man kann den Spottbereich von oben her einrücken. Wird hauptsächlich zu Testzwecken verwendet, oder wenn man den selben Probensatz mehrmals auf dem selben Slide haben möchte.(Angabe in mm).

### **Microtiterplatten Parameter:**

Microtiterplatten Typ: In der Datei „MicroPlates.dat“ können verschiedene Microtiterplatten definiert werden. Dazu benötigt man folgende Daten: Firma / Hersteller, Gesamtanzahl der Wells, Anzahl in X Richtung, Anzahl in Y Richtung, Well to Well Abstand, Well Tiefe, Well Durchmesser, Minimalmenge in den Wells, Maximalmenge, Abstand vom Rand X, Abstand vom Rand Y und die Höhe. Alle Angaben in mm und  $\mu\text{l}$ .

Gefüllt bis: Wenn eine Platte nicht voll ist, kann angegeben werden bis wohin sie mit Proben befüllt ist. Zuerst muss eine Reihe voll sein, bevor eine neue Spalte begonnen werden darf.

**Parameter für die XYZ-Bewegung:**

Um die Spots in möglichst kurzer Zeit aufzubringen, wurden alle Bewegungsabläufe optimiert.

Man kann die Geschwindigkeit der XY Bewegung von 1-80 mm/s einstellen. Die Z-Achse von 1-40 mm/s. Hierbei ist zu bedenken, dass der Motor bei halber Geschwindigkeit noch annähernd das volle Drehmoment besitzt und der Höchstgeschwindigkeit nur mehr das Halbe.

Weiters kann die Zeit der Probenaufnahme definiert werden.

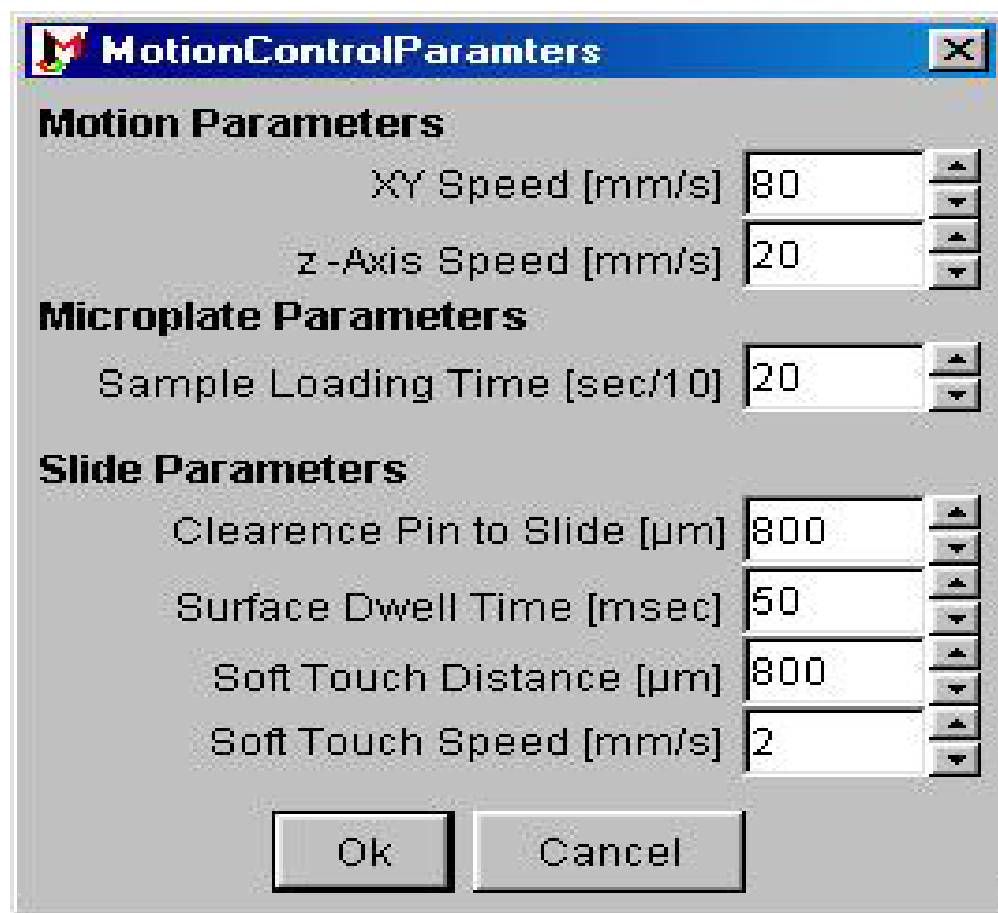


Abbildung 22: Bewegungsparameter

SoftTouch: Bei den Slide Parametern kann der Abstand vom Pin zum Slide bei den Replications und die Zeit die der Pin am Slide aufsetzt, eingestellt werden.

Mit der Soft Touch Funktion kann man den Pin langsamer auf den Slide aufsetzen. Dazu wird die Distanz zum Slide definiert und die Geschwindigkeit mit der, der Pin aufsetzt.

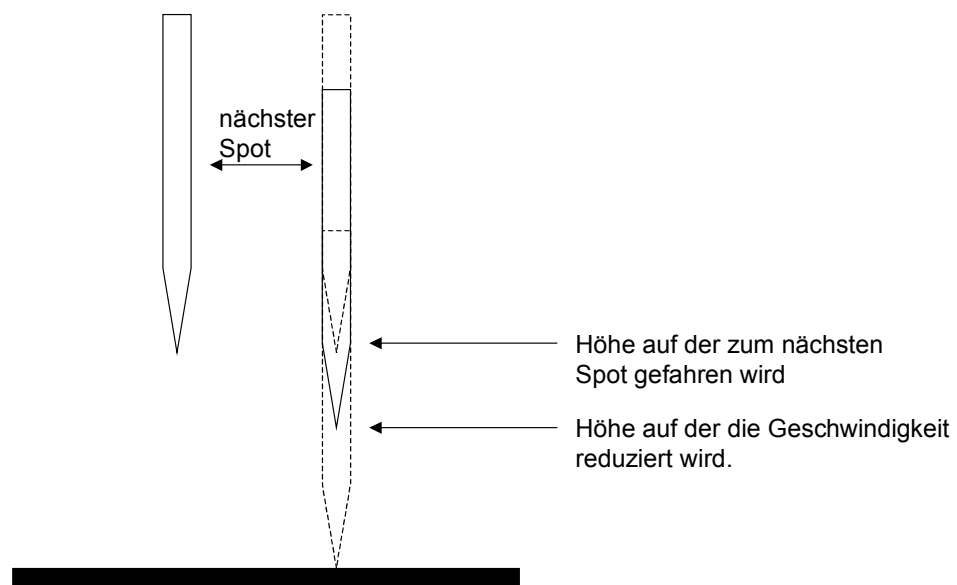


Abbildung 23: Soft Touch Abstände

Zusätzlich wurden alle Programmteile getestet und geprüft. Es traten dabei einige Fehler zu tage, die behoben wurden. Die Problematik war durch die große Anzahl an variablen Parametern das, dass Testen in allen Variationen viel Zeit in Anspruch nahm.

## Steuerungsprogramm

Die vorhandene Steuerung des XYZ-Gestelles wurde durch eine neue ersetzt. Die Gründe dafür waren folgende:

- Die Steuerung war instabil (Netzteil, CPU).
- In das Programm konnte nur über die Mitarbeiter der Fa. Vexel zugegriffen werden
- Die neue Steuerung ist eine Industriesteuerung und somit noch mindestens 10 Jahre standardmäßig verfügbar, d.h. das System bleibt wartbar.

Um nicht das ganze PC Programm zu adaptieren, wurden die Befehle an der Schnittstelle zwischen PC und Gerät adaptiert. Der Spot Befehl musste dennoch verändert werden um die vorgenommenen Änderungen überhaupt möglich zu machen.

## Testreihen

### Das Raster

Ein wichtiger Parameter für einen Spotter ist das Raster auf dem er die Proben aufbringen kann, und wie konstant er die Abstände einhalten kann.

Um dies zu überprüfen wurde ein Cluster von 600 Spots aufgetragen. Gespottet wurde in zwanzig Reihen zu je dreißig Spalten. Das Spotmaterial bestand aus den Farbstoffen CY3 und CY5 gelöst in 50% DMSO. Die Konzentration wurde mit  $10^{-4}$  mol/L gewählt. Die Farbstoffe wurden abwechselnd mit fünfzehn Replicates aufgetragen. Als Pin wurde ein TeleChem Stealth Pin SMP 3B verwendet. Gespottet wurde auf TeleChem Slides.

Anschließend mit einem GenePix 4000B Scanner eingescannt. Zur Auswertung wurde das automatische Tool der GenePix Software verwendet. Dieses wurde anschließend als Text File ausgegeben und mit MS-Excel gelesen. Ausgewertet wurden die Spalten in denen der Spotter eine neue Probe aufnimmt und erneut an das bereits erstellte Raster Proben weiter spottet.

### Das Waschen und Trocknen

Für diesen Versuch konnten die Ergebnisse aus dem obigen Versuch verwendet werden, da in dieser Versuchsanordnung bereits die Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 abwechselnd gespottet wurden. Sollte der Waschvorgang unzureichend sein wird gleichzeitig ein Fluoreszenzsignal des anderen Farbstoffes detektiert.

### **Der Spottedurchmesser**

Um den Spottedurchmesser zu testen, wurde das Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) gespottet. Mit dem sogenannten Stainingprotokoll (Vorgangsweise im Anhang) wurden die Gene mit SYBR Green I eingefärbt. Danach wurde der Glasträger eingescannt und ausgewertet.

### **Die Spothomogenität**

Für die Auswertung der Spothomogenität wurde der Glasträger mit den aufgetragenen Farbstoffen der bei der Evaluierung des Rasters erstellt wurde, mit dem Glasträger des Spottedurchmesserversuches verglichen. Auf letzteren sind PCR Produkte des Gens GAP DH aufgebracht.

Verglichen wurde der Meanwert der Vordergrundpixelintensität des grünen Kanals mit dem Medianwert des selben Kanals.

### **Verdünnungsreihe**

Hier wurde eine Verdünnungsreihe mit 8 Verdünnungen des PCR-Produktes (GAPDH) gespottet. Die Konzentrationen des Gens wurde in  $10^{-1}$  mol/L Schritten gesenkt und es wurden jeweils 15 Replicates gespottet.

Diese 8 Proben wurden gespottet und mit SYBR Green I eingefärbt. Das Bild wurde mit dem Softwarepaket des Scanners bewertet. Von jeweils 15 gleichen Replicates wurde der Mittelwert genommen und der Mittelwert der Hintergrundfluorescents abgezogen.

### 3. ERGEBNISSE

---

#### Raster

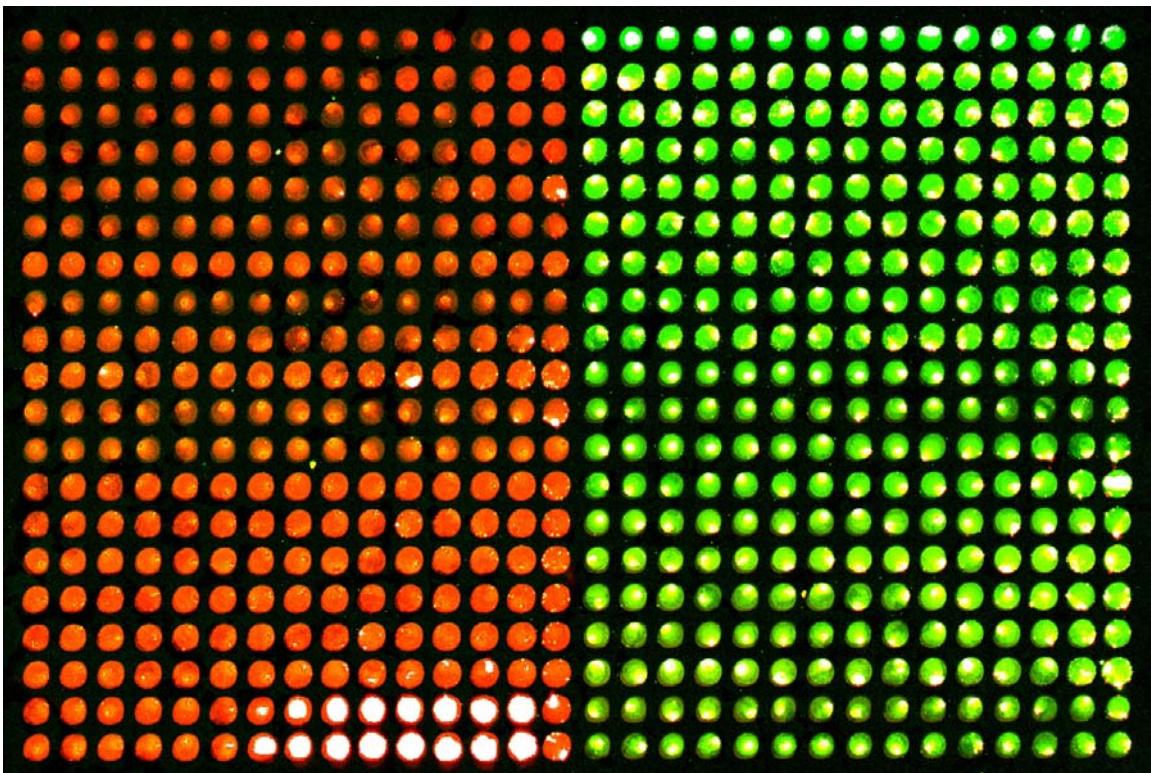


Abbildung 24: 600 Spots Abwechselnd CY3 und Cy5

Die Auswertung dieses Arrays bezüglich der Positionierung ergab folgende Ergebnisse:

**X-Achse:** Bewertet wurden die Spalten 14, 15, 16 und 17. Aus den ersten beiden Spalten kann der Spot zu Spot Abstand innerhalb von gespotteten Replicates errechnet werden. Zwischen Spalte 15 und 16 nimmt der Spotter eine neue Probe auf. Dazu fährt er zuerst zum Wasch- und Trockenbecken, danach nimmt er die Probe auf und reinigt den Pin am Cleaningslide.

Anschließend setzt er an das bereits bestehende Raster an und spottet weitere 15 Replicates. Zwischen Spalte 16 und 17 kann der Spot zu Spot Abstand gemessen werden.

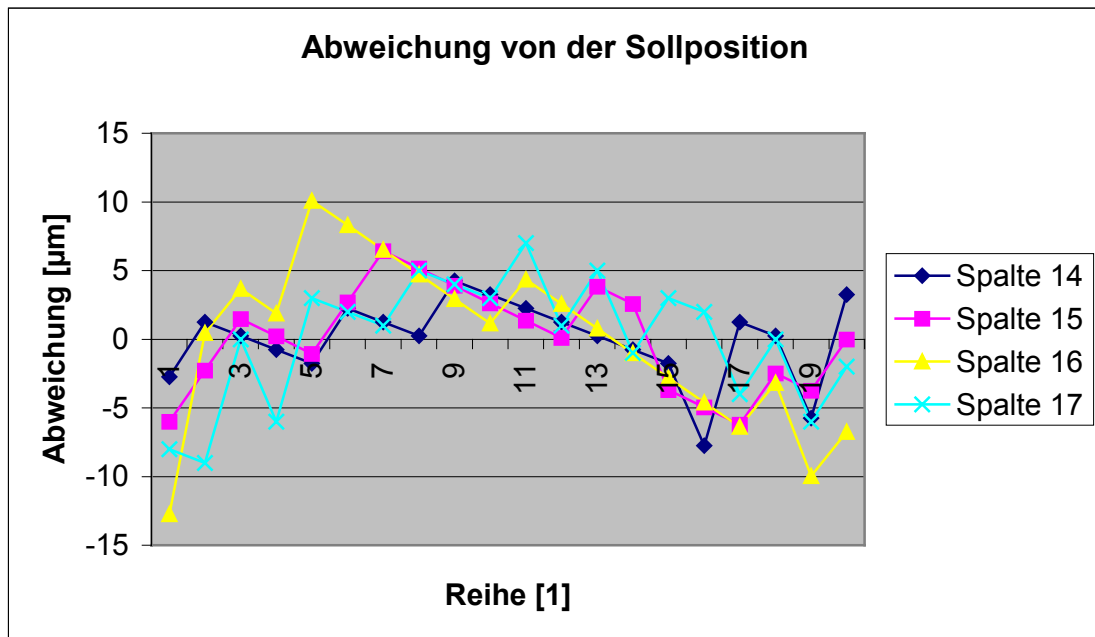


Abbildung 25: Abweichung der Spalte 14, 15, 16 und 17 von der Sollposition bei einer Positionierung mit der X Achse

Liegen alle Spots einer Spalte an einer vertikalen Linie, besitzt der Spotter eine hohe Wiederholgenauigkeit. Dies ist sehr wichtig, damit der Spotter nach dem aufnehmen einer Probe an das bereits gespottete Raster ansetzen kann. Die Abweichung der X-Achse von der Sollposition wurde in Abbildung 25 dargestellt. Der Fehler in der Positionierung beträgt +10 µm und -12.5 µm. Diese Werte liegen innerhalb der geforderten Toleranz.

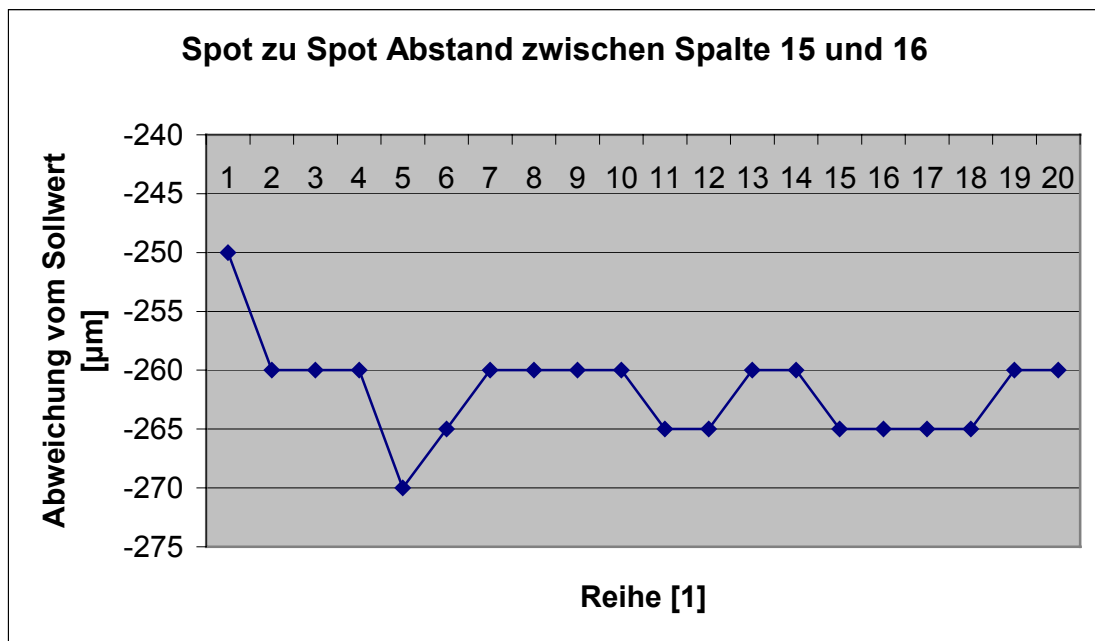


Abbildung 26: Abweichung vom Mittelwert des Spot zu Spot Abstandes zwischen Spalte 15 und 16

Der Sollwert des Spot zu Spot Abstandes zwischen Spalte 15 und 16 beträgt 260 µm. Die Abweichung von diesen Wert ist in Abbildung 26 ersichtlich.

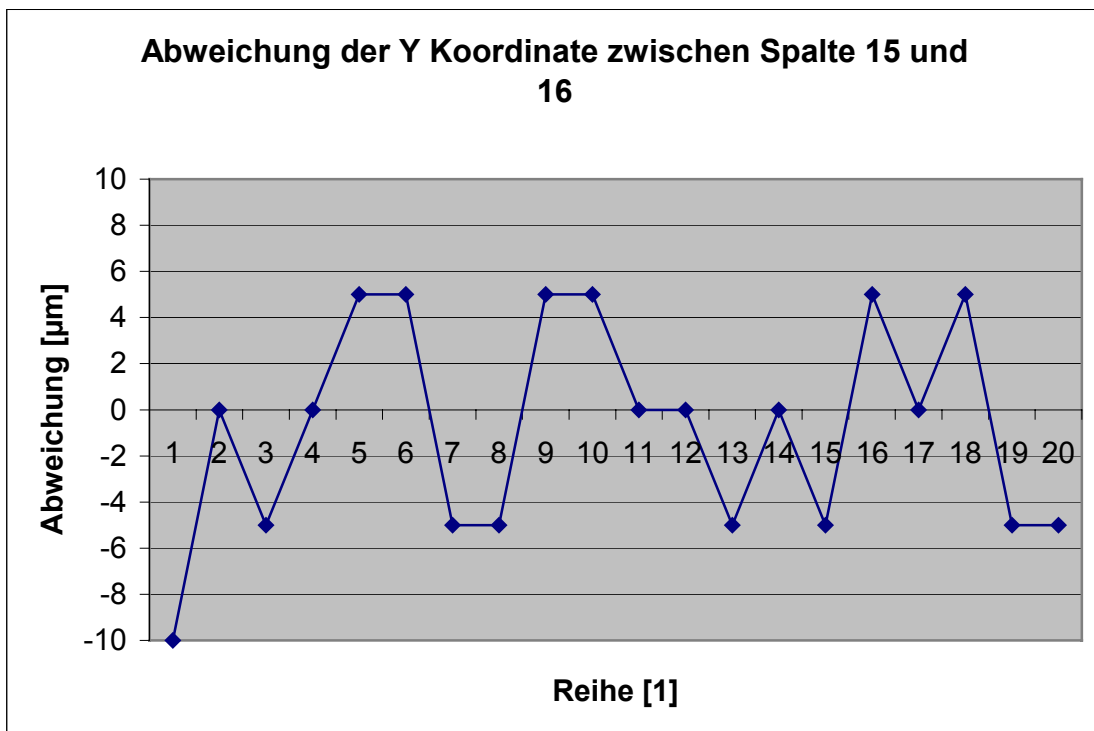


Abbildung 27: Abweichung von der Sollposition bei einer Positionierung mit der Y Achse

**Y Achse:** Die Y Achse muss nach dem aufnehmen einer Probe exakt in einer horizontalen Linie fortsetzen, damit sich ein Raster in der waagerechten Linie ergibt. Die Analysen bezüglich der Positioniergenauigkeit der Y-Achse ergab ein ähnliches Ergebnis. Die Abweichung beträgt  $+5 \mu\text{m}$  /  $-10 \mu\text{m}$ .

## Waschen und Trocknen

---

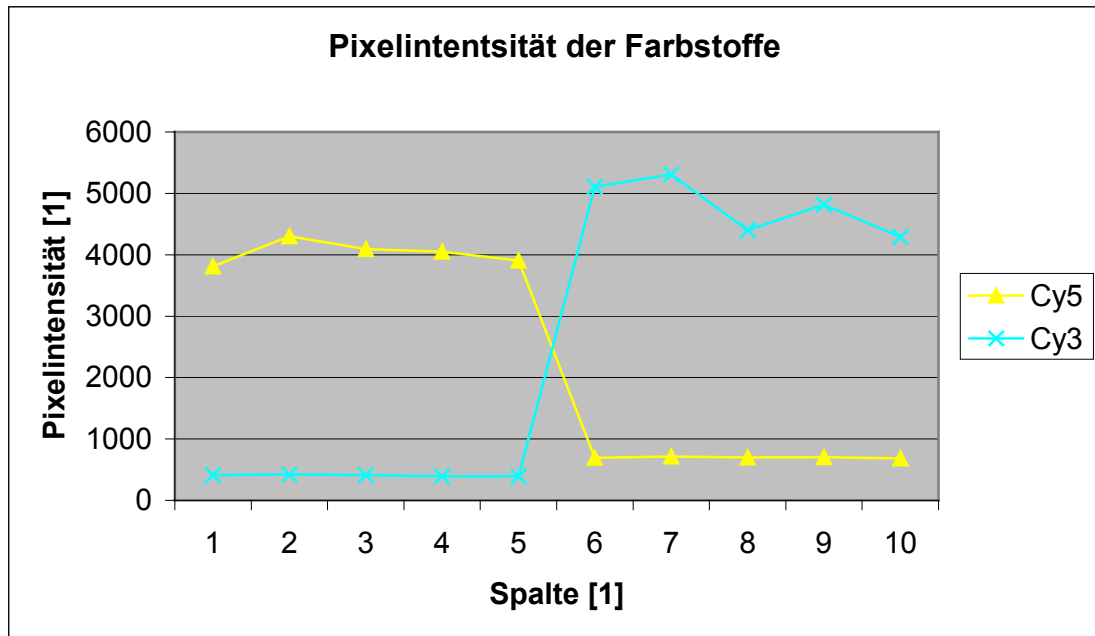


Abbildung 28: Pixelintensität von zehn Spalten des Glasträger mit abwechselnd gespotteten Cy3 und Cy5 Farbstoffen (Abbildung 20)

In Abbildung 28 wurde die Pixelintensität der abwechselnd gespotteten Farbstoffe Cy3 und Cy5 dargestellt.

## Spotdurchmesser

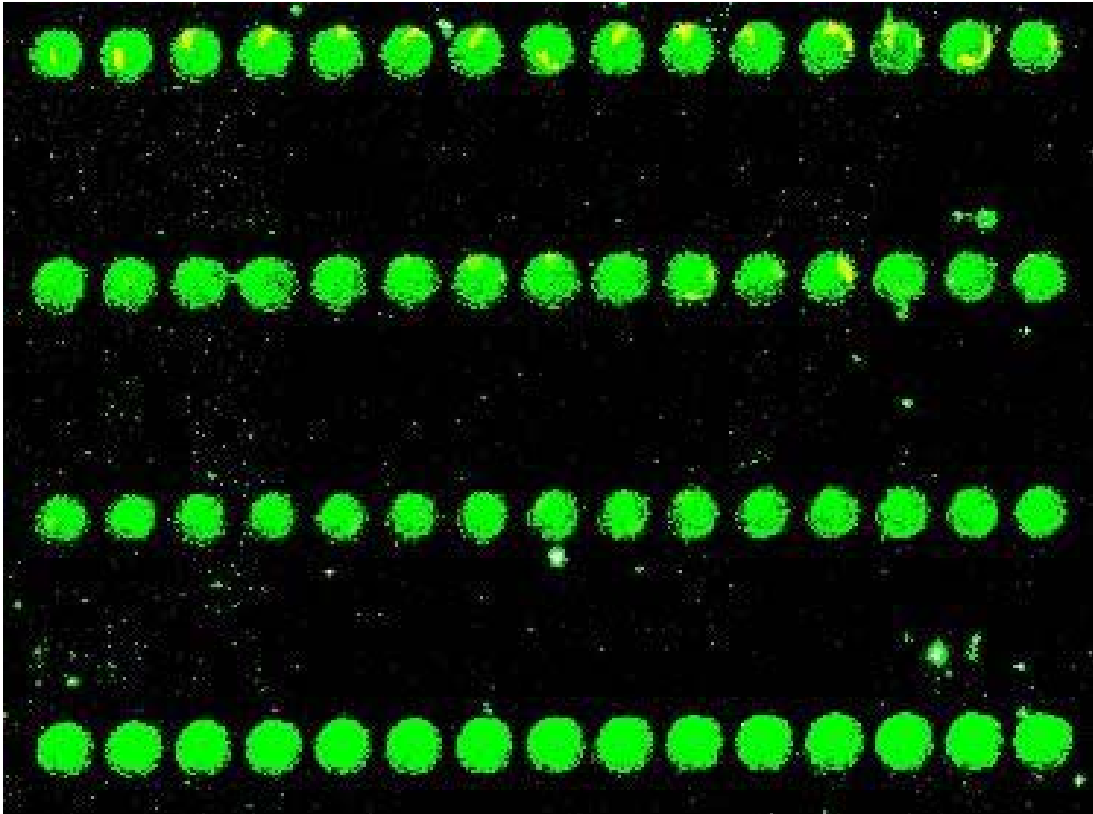


Abbildung 29: GAP DH mit SYBR Green I, Stainigprotokoll, 4 Reihen a 15 Spots

Zur Untersuchung des Spotdurchmessers wurde ein Slide mit fünfzehn mal gespottetem PCR Produkt (GAPDH) verwendet.

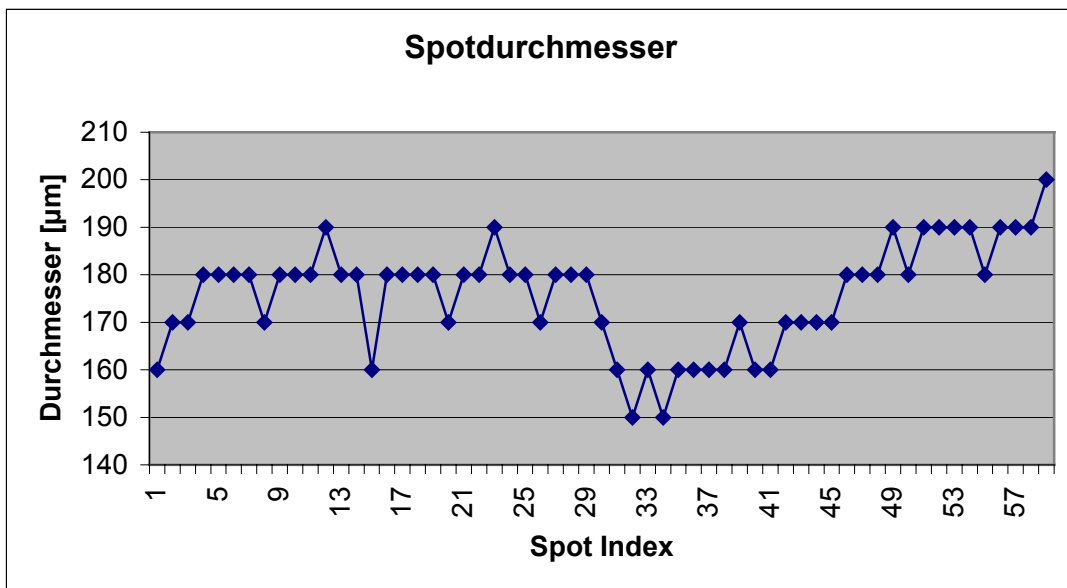


Abbildung 30: Spotdurchmesser

Der Mittelwert des Spotdurchmesser von 60 Spots lag bei 175,7µm. Der Minimalwert bei 150µm, der maximale bei 200µm.

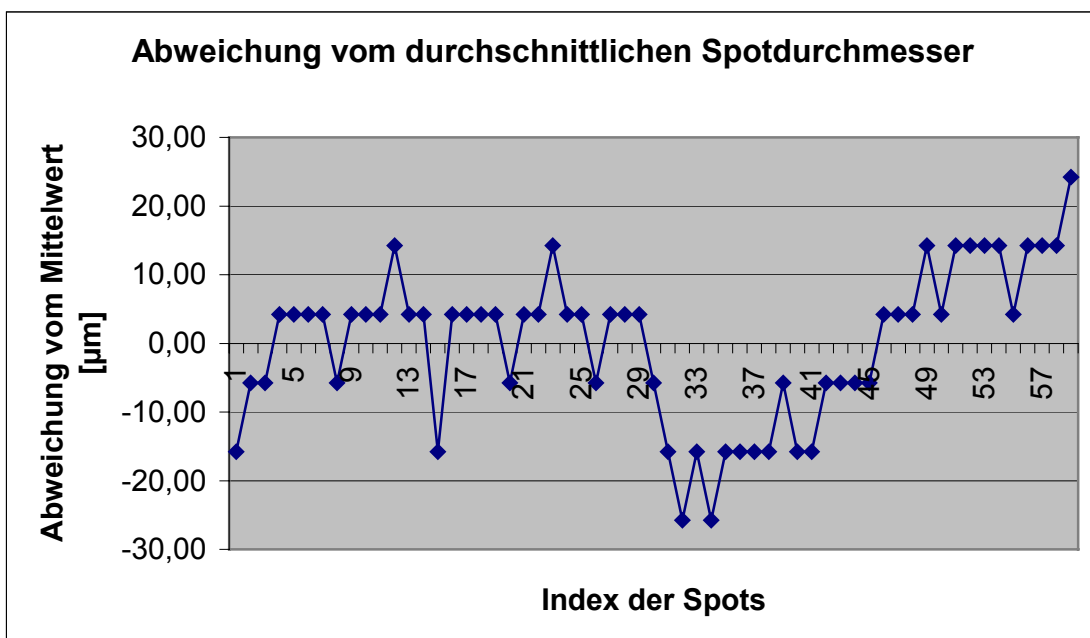


Abbildung 31: Abweichung vom durchschnittlichen Spotdurchmesser

## Spothomogenität

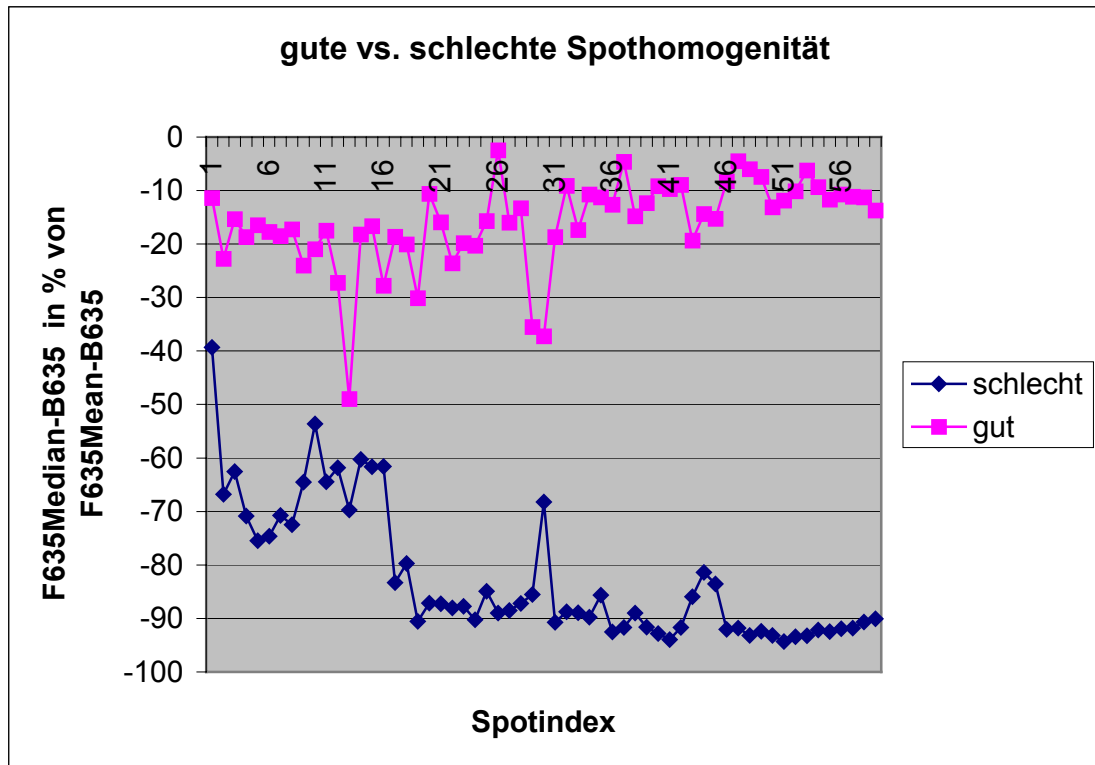


Abbildung 32: Darstellung von F635Median-B635 in % von F635Mean-B635, gut: Glasträger mit Gen GAP DH, schlecht: Glasträger mit grünem Farbstoff

Der Mean Wert oder Mittelwert ist der Mittelwert aus allen Pixelintensitäten des Spots. Der Median entspricht dem mittigen Wert der Pixelintensitätsverteilung. Dazu werden die Werte sortiert und der Wert genau bei der Hälfte genommen. Ist die Intensitätsverteilung symmetrisch (homogen) entspricht der Median- dem Meanwert. Weicht die Verteilung von Symmetrie ab, weicht auch der Median von dem Mean ab. Wie in Abbildung 32 ersichtlich, entspricht der Median Wert der Pixelintensität bei schlechter Homogenität wesentlich weniger dem Meanwert.

## Verdünnungsreihe

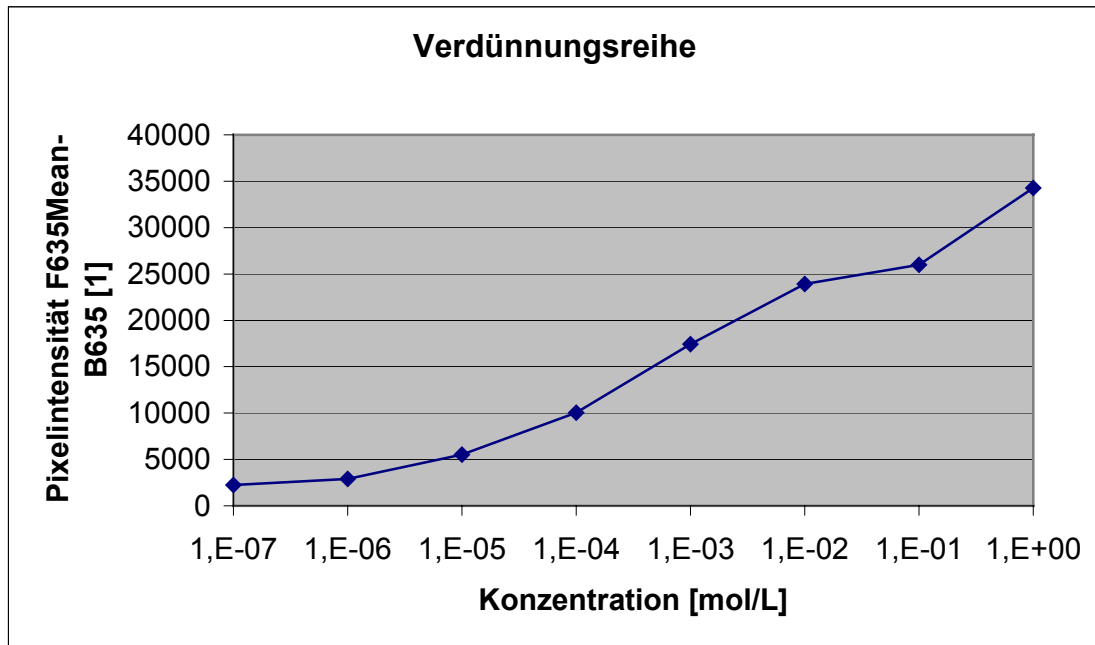


Abbildung 33: Pixelintensität der Verdünnungsreihe

Nach der Einfärbung der Gene GAPDH mit SYBR Green I wurde jeweils der Mittelwert von Vordergrund und Hintergrund des Kanals 635 nm ermittelt. Diese beiden Werte wurden voneinander abgezogen und in der Abbildung 33 eingetragen.

## 4. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde ein Spotter für cDNA Microarrays entwickelt und getestet. Bei diesem Spotter sind alle Parameter und Algorithmen frei zugänglich und veränderbar. Durch diese Flexibilität eignet er sich besonders zur Weiterentwicklung der Spottechnologie, wie z.B. das Spotten von Proteinen.

Im speziellen wurden folgende Modifikationen durchgeführt.

Es wurden zusätzliche Komponenten wie Vakuum, Wassererzeugung und Gehäuse zugefügt. Eine Evaluierung des gesamten Systems wurde mit Hilfe von Testreihen, wobei fluoreszierende Farbstoffe und PCR Produkte gespottet wurden, durchgeführt.

Die Grundplatte des Prototypen erwies sich als sehr funktionell und wurde beibehalten. Die Bewegungsgeschwindigkeit der Achsen wurde durch den Einbau neuer stärkerer Motoren wesentlich erhöht. Die Zeit zum Spotten wurde dadurch drastisch gesenkt.

Der Wasch- und Trockenvorgang konnte durch die durchgeführten Modifikationen an den Becken, deutlich verbessert werden. Dadurch konnten neue Parameter eingestellt werden die eine wesentlich kürzere Zeitdauer für diesen Vorgang darstellen. Mit dieser Zeitersparnis und der durch die Motoren konnte die Spotzeit beinahe halbiert werden.

Durch die integrierten Vakuumpumpe und der integrierten Reinwasserherstellung wurde der Spotvorgang automatisiert. Man startet den Spotvorgang und der Spotter sorgt selbstständig für die notwendige Vakuumluft und Wassermenge die er zum Reinigen der Pins benötigt.

Das PC-Programm wurde um einige Funktionalitäten erweitert. Der Ausbau der Einstellmöglichkeiten für die Bewegung der Achsen erlaubt eine weite Variation aller Parameter. Durch die Implementierung des Soft Touch konnte die Spotqualität deutlich verbessert werden. Dies bewirkt eine hohe Zeitersparnis bei der Auswertung der Glaträger. Die Möglichkeit, Fehler und

Statusmeldungen per E-Mail oder SMS zu versenden, erwies sich als sehr nützlich, zudem der jetzige Standort des Spotters um ein Stockwerk niedriger liegt als der gewöhnlich Aufenthaltsort der Mitarbeiter.

Zusammenfassend, in dieser Arbeit wurde ein flexibles und robustes Gerät für den Einsatz in der molekularen Biotechnologie entwickelt.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Brazma Alvis, Vilo Jaak: Gene expression data analysis; European Molekular Biology Labaratory, Outstation Hinxtton – the Eropean Bioinformatic Institut Cambridge CB10 ISD, UK; 2000
- [2] Young A. Richard: Biomedical Discovery with DNA Arrays; Nine Cambridge Center, Cambridge, Massachusetts 02141; Department of Biology, Massachusetts Institut of Technology, Cambridge, Massachusetts 02139; 2000
- [3] Lockhart J. David, Winzeler A. Elisabeth: Genomics, gene expression and DNA arrays; Genomics Institute of the Novaris Research Foundation, 3115 Maryfield Row, San Diego, California 92121, USA, 2000
- [4] Quackenbush John: Computational Analysis of Microarray Datas; The Institut of Genomic Research, 9712 Medical Center Drive, Rockville, Maryland 20850, USA, 2001
- [5] Eisen B. Michael, Brown O. Patrick: DNA Arrays for Analysis of Gene Expression, Departments of Genetics and Biochemistry and the Howard Hughes Medical Institute, Stanford University School of Medicine, Stanford 93405 California, USA, 1999
- [6] Duggan J. David, Bittner Michael, Chen Yidong, Metzler Paul, Trent M. Jeffrey: Expression profiling using cDNA Microarrays, Cancer Genetics Branch, National Human Genomic Research Institute, National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA, 1999
- [7] Schulze Almut, Downward Julian: Navigating gene expression using microarrays – a technology review, Signal Transduction Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, 44Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX, UK, 2001
- [8] Nadon Robert, Shoemaker Jenifer: Statistical issues with microarrays: processing and analysis, Imaging Research Inc., Brock University, 500 Glenridge Ave, St. Catharines, Ontario, Canada L2S 3A1 and Duke University Medical Center, 208 Hanes House, Box 3958, Durham, NC27710 USA, 2002

## 6. ANHANG A

---

### **SYBR Green I Protokoll zum Einfärben von DNA microarrays [1]**

SYBR Green I bindet mit hoher Affinität doppelsträngige DNA. Nach der Bindung des Farbstoffes an die DNA (Interkalation) wird die Fluoreszenz um ein vielfaches verstärkt.

1. Gespottete Glasträger 30s in 0.1% SDS waschen.
2. Spülen in 2 großen Gefäßen mit ddH<sub>2</sub>O.
3. Färben für 3min in 1:20000 SYBR Green I Verdünnung mit TE (pH 7.5).
4. 5min waschen in 0.2% Triton X-100.
5. Spülen in 2 großen Gefäßen mit ddH<sub>2</sub>O.
6. 7min in Hexan waschen
7. Den Glasträger langsam aus der Hexanlösung ziehen.
8. Eingefärbten Glasträger mit einer Anregungswellenlänge von 532nm einscannen.

[1] [http://genetics.med.harvard.edu/~dudley/oligo\\_arrays/staining.html](http://genetics.med.harvard.edu/~dudley/oligo_arrays/staining.html)

## **Annerkennung**

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Begutachter Dr. Zlatko Trajanoski und meinem Betreuer DI Hubert Hackl für fortlaufende Unterstützung und Betreuung. Ebenso möchte ich mich bei DI Michael Maurer bedanken. Er erstellte den Prototypen und gab mir alle notwendigen Unterlagen weiter. Auch stand er mir mit Rat und Tat zur Seite und bei Fragen zum Prototypen nahm er sich stets Zeit um diese zu beantworten. Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglicht haben.