

High-Speed Mikroskopie für Zellkulturanalysen

Robert Schmitt^{1,2}, Friedrich Schenk²

¹Werkzeugmaschinenlabor WZL der RWTH Aachen

²Fraunhofer-Institut für Produktionstechnologie IPT, Aachen
Tel.: 0241-8904218, e-mail: friedrich.schenk@ipt.fraunhofer.de

Kurzfassung

Mit der vorgestellten Entwicklung ist es möglich, größere zusammenhängende Bereiche, z.B. Zellen in einem Zellkulturgefäß, aus der Bewegung heraus ohne Anhalten in kürzester Zeit zu mikroskopieren. Bewegungsunschärfe wird dabei durch ein innovatives Blitz-Beleuchtungskonzept vermieden. Für die Bildschärfe beim kontinuierlichen Mikroskopieren sorgt eine Piezo-basierte Fokuskorrektur. Alle Komponenten zur Bildakquise werden über einen Hardware-Controller synchronisiert und können an jedem handelsüblichen Mikroskop genutzt werden. Das neuartige Verfahren ermöglicht aufgrund des hohen Durchsatzes mikroskopische 100%-Prüfungen.

1 Einleitung

In der Zellkultur ist es erforderlich, den Zustand von Zellen insbesondere ihr Wachstumsverhalten regelmäßig zu kontrollieren. Aufgrund der winzigen Abmessungen im μm -Bereich lassen sich Zellen morphologisch nur unter mikroskopischer Vergrößerung beurteilen. In der Zellkultivierung bedient man sich häufig adhärenter Zellen, die auf transparenten Kunststoffböden spezieller Zellkulturgefäße wachsen und dabei von Nährmedium umgeben sind. Besonders verbreitet ist ein spezielles Format von Zellkulturgefäßen mit mehreren Kompartimenten, sogenannte Mikrotiterplatten (MTPs). In den einzelnen Bereichen, den Wells, können mehrere Zellpopulationen räumlich getrennt voneinander auf der gleichen Platte kultiviert werden. Gängige Mikrotiterplatten weisen zwischen 6 und 1536 einzelne, meist runde Wells auf, die auf einer Grundfläche von etwa 127 x 85 Millimetern angeordnet sind. Die Platten bestehen üblicher-

weise aus transparentem spritzgegossenem Kunststoff. Daneben existieren Platten mit Folien- oder Glasböden, die aber teurer und weniger stark verbreitet sind. Mikrotiterplatten dienen zum einen als Behältnis zur Zellkultivierung, zum anderen fungiert ihr transparenter Boden als Träger für inversmikroskopische Untersuchungen, die oft in Phasenkontrast- oder Fluoreszenzmikroskopie stattfinden. Für quantifizierbare Ergebnisse ist es oft erforderlich, die gesamte Wachstumsfläche, also alle befüllten Wells einer Mikrotiterplatte, vollständig zu erfassen. Bei dem kleinen Sichtfeld eines Mikroskopobjektivs von wenigen Quadratmikrometern und der im Vergleich dazu beträchtlichen Grundfläche einer Mikrotiterplatte von mehr als 10.000 mm², sind tausende von Einzelaufnahmen notwendig, um eine gesamte Platte flächendeckend zu mikroskopieren. Selbst mit einem noch relativ moderat vergrößernden 10x Objektiv, sind knapp 19.000 Einzelaufnahmen bei einem Standard 2/3“ Kamerachip erforderlich.

1.1 Stand der Technik

Problematisch beim Mikroskopieren großer Flächen mit herkömmlichen Mikroskopen ist die Tatsache, dass für jedes Einzelbild ein extra Positioniervorgang erforderlich ist. Für alle Aufnahmen aufaddiert, ergibt dies einen beträchtlichen Zeitbedarf. Mathematisch ausgedrückt ist der Gesamtzeitbedarf t_{gesamt} durch

$$t_{\text{gesamt}} = n_{\text{Aufnahmen}} \cdot t_{\text{Aufnahme}} + t_{\text{Autofokus}} \quad \text{mit} \quad t_{\text{Aufnahme}} = t_{\text{Positionierung}} + t_{\text{Belichtung}} \quad (1)$$

gegeben. Dabei repräsentieren $n_{\text{Aufnahmen}}$ die Anzahl der Einzelbilder, t_{Aufnahme} die Aufnahmedauer einschließlich Positionier- und Belichtungszeiten und $t_{\text{Autofokus}}$ die Zeit für Autofokusmessungen im Vorfeld der eigentlichen Aufnahmen. Bei einer großen Anzahl an Aufnahmen hat das Produkt $n_{\text{Aufnahmen}} \cdot t_{\text{Aufnahme}}$ den größten Einfluss auf die Aufnahmedauer. $n_{\text{Aufnahmen}}$ lässt sich für ein vorgegebenes Objekt nur begrenzt reduzieren, indem man das Field of view (Sichtfeld) des Mikroskopobjektivs vergrößert. Dies lässt sich durch die Wahl einer kleineren Vergrößerung erreichen, was aber oft keine Option ist, da ja gerade aufgrund einer gewünschten Vergrößerung mikroskopiert wird. Andererseits lässt sich das Field of view durch die Wahl eines möglichst großen Kamerabildsensors ausdehnen. Hier sind allerdings durch die Mikroskopoptik und die verfügbaren Sensorgrößen Grenzen gesetzt. Die meisten Mikroskope leuchten Chips bis zu

einer Fläche von $4/3$ “ (Chipdiagonale 22 mm) vignettierungsfrei aus. Letztendlich müssen beim Mikroskopieren großflächiger Objekte von einigen Quadratzentimetern immer tausende von Einzelaufnahmen erzeugt und verarbeitet werden. Demnach liegt das größere Potential zur Zeitersparnis in der Reduktion der Aufnahmedauer t_{Aufnahme} jeder Einzelaufnahme.

Die Belichtungszeit ist speziell bei Hellfeld- und Phasenkontrastaufnahmen im Vergleich zur Positionierzeit vernachlässigbar klein. Der Hauptzeitbedarf kommt durch die Probenpositionierung zustande. Das Positionieren geschieht bei modernen automatisierten Mikroskopen durch einen motorischen Kreuztisch, der die Probe schrittweise verfährt. An jeder Stelle der Mikrotiterplatte hält der Tisch an und über die Optik wird ein vergrößertes Bild mit einer digitalen Kamera aufgezeichnet bevor die Platte zur nächsten Position bewegt wird. Dieser Vorgang wiederholt sich für jede Mikrotiterplatte tausende Male. Um die auftretenden Positionierungsgenauigkeiten auszugleichen, wird der Mikroskopisch häufig kürzer verfahren als die Kantenlänge des Objektiv-Sichtfeldes, so dass die aufgenommenen Bilder überlappen und anschließend über einen Stitching-Algorithmus vor dem Zusammensetzen genau zueinander positioniert werden können. Ein zusätzliches Blending sorgt in diesem Falle noch dafür, dass die Übergänge der Einzelbilder verschwimmen, indem eine Intensitätsanpassung erfolgt [1]. Um den Mikroskopierprozess signifikant zu verkürzen, müssen die Positionierzeiten verkürzt werden. Einer Beschleunigungs- und Geschwindigkeitssteigerung sind hier allerdings Grenzen gesetzt, da zu abruptes Anfahren und Abstoppen zu Schwankungen des Nährmediums in den Mikrotiterplatten führt. Durch die Schwankungen der Wasseroberfläche ändert sich der Einfallswinkel der Durchlichtbeleuchtung, wodurch das Licht unterschiedlich stark gebrochen bzw. reflektiert wird. Die auf dem Sensor auftreffende Lichtmenge variiert damit bei jeder Aufnahme. Die einzelnen Bildkacheln des zusammengesetzten Übersichtsbildes sind unterschiedlich belichtet. Das resultierende inhomogene Gesamtbild ist schwierig zu analysieren, insbesondere durch automatisierte Bildverarbeitungsalgorithmen. Eine Verkürzung der Aufnahmedauer durch erhöhte Beschleunigungswerte ist auf Kosten der Bildqualität nicht tolerierbar. Deshalb sind sanfte Beschleunigungswerte und Pausen zwischen den Aufnahmen bei flüssigkeitsgefüllten Proben, die in der Zellkultur üblich sind, zwingend erforderlich.

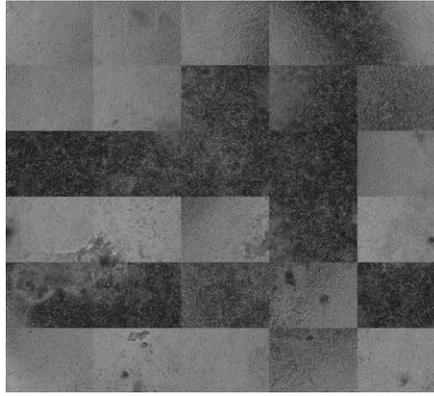


Bild 1: Inhomogene Beleuchtung infolge von Flüssigkeitsschwankungen aufgrund zu hoher Beschleunigungswerte beim konventionellen Mikroskopieren

Aufgrund der resultierenden geringen Bildraten von max. 1-2 Bilder pro Sekunde (fps) dauert die Erfassung einer kompletten Mikrotiterplatte mit einem herkömmlichen Mikroskop abhängig von der Objektivvergrößerung mehrere Stunden. Während des Mikroskopierens außerhalb des Inkubators fehlen den Zellen zudem die idealen Umgebungsbedingungen (37°C und $5\% \text{CO}_2$), die sie zum Gedeihen benötigen. Selbst für die manuelle Zellkultur im Labormaßstab, bei der nur wenige Platten parallel kultiviert werden, entsteht durch das Mikroskopieren ein immenser Zeitaufwand. Bei der automatisierten Zellkultur im industriellen Maßstab, wo hunderte von Platten parallel kultiviert und mikroskopiert werden, stößt die herkömmliche Mikroskopie an ihre Grenzen.

2 Neuartige Lösung

Am Fraunhofer-Institut für Produktionstechnologie IPT wurde die herkömmliche automatisierte Lichtmikroskopie zu einem hochdurchsatzfähigen Mikroskopieverfahren weiterentwickelt, das zur Prozesssteuerung und Qualitätskontrolle in einer vollautomatisierten Produktionsanlage zur Erzeugung induziert pluripotenter Stammzellen eingesetzt wird [2], [3]. Darüber hinaus eignet sich das neue Verfahren als Aufrüttlösung für jedes handelsübliche Mikroskop, um die Mikroskopiezeiten drastisch zu reduzieren.

Bei der neuartigen Technik wird das Anhalten und Anfahren („Stop-and-Go“) durch ein kontinuierliches Scanning ersetzt, bei der die Proben aus der Bewe-

gung heraus mikroskopiert werden [4]. Damit lässt sich die Bildrate drastisch erhöhen, wodurch der Zeitbedarf für das Mikroskopieren großer zusammenhängender Flächen wie Mikrotiterplatten erheblich sinkt. Da der Kultivierungsbereich der einzelnen Wells einen Großteil der Gesamtfläche einer Mikrotiterplatte ausmacht und die Zwischenräume gerade bei Formaten mit hoher Well-Anzahl sehr klein und unzusammenhängend sind, ist es ratsam, eine komplett befüllte MTP in einem kontinuierlichen Scan ganzflächig zu mikroskopieren. Dabei macht es Sinn, nicht wellweise, sondern in Mäanderform, zeilenweise über die gesamte Breite der Mikrotiterplatte zu verfahren. Somit muss die kontinuierliche Bewegung nur zweimal am Anfang und Ende einer Zeile unterbrochen werden.

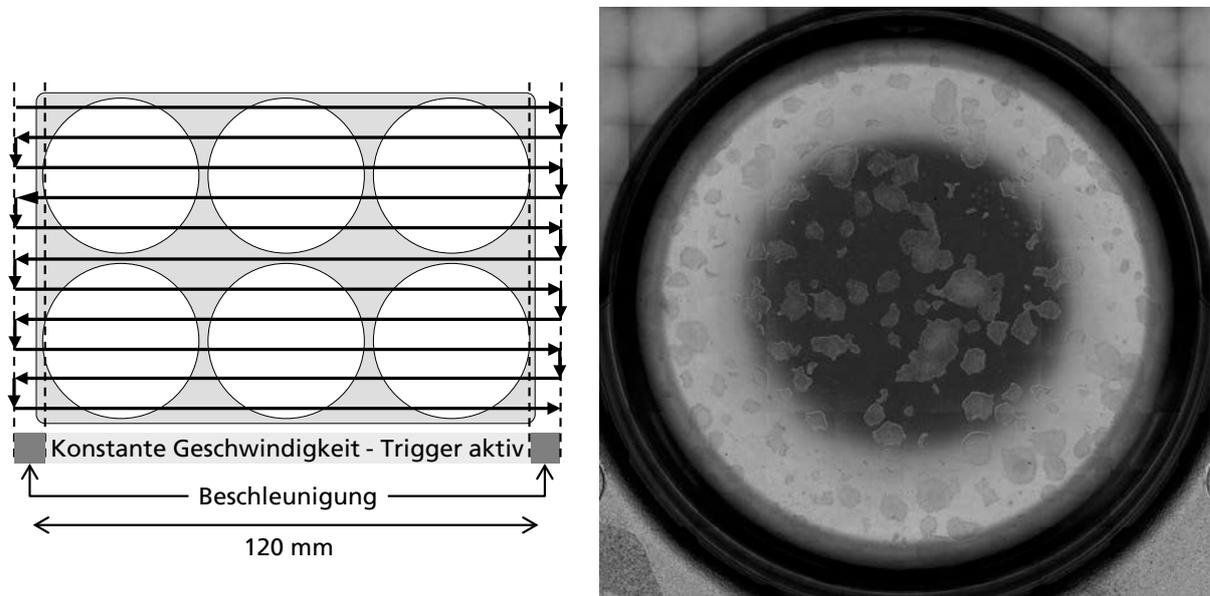


Bild 2: Links: Aufnahmeschema mit möglichst wenigen Unterbrechungen
Rechts: Zusammengestitchte Phasenkontrastaufnahme eines Wells einer
6-Well MTP mit Stammzellkolonien aufgenommen durch kontinuierlichen
Scan bei 34 mm/s

Eine ganze Mikrotiterplatte lässt sich damit in wenigen Sekunden mikroskopieren. Herkömmliche Mikroskope benötigen dafür Stunden. Durch die kontinuierliche Bewegung treten leichte Flüssigkeitsschwankungen des Mediums nur noch in den Beschleunigungsphasen auf. Bei sanften Beschleunigungen hat dies aber keinen Einfluss auf die Bildqualität. Das Ergebnis sind sehr homogen beleuchtete, automatisiert auswertbare Übersichtsbilder mit mikroskopischen De-

tails, bei denen der Übergang der Einzelaufnahmen kaum wahrnehmbar ist. Letzteres ist auf einen Shading-Korrektur Algorithmus zurückzuführen, der für sehr homogene Intensitäten im gesamten Bildfeld sorgt.

2.1 Konzept

Voraussetzung für das Mikroskopieren aus der Bewegung ist eine exakte Synchronisation der verschiedenen Komponenten zur Bildakquisition. LED-Blitz, Kamera und Tischbewegung (x, y, z) werden in Echtzeit über einen Tischcontroller (Märzhäuser Wetzlar) mit wegsynchronem Trigger synchronisiert. Die Präzision der Synchronisierung ist dabei so hoch, dass die Einzelbilder überlappungsfrei aufgenommen werden können. Ein aufwändiger Stitching Algorithmus mit Blending Funktionalität kann damit komplett entfallen. Das Konzept ist vergleichbar mit dem Prinzip von Zeilenkameras, nur dass anstelle einzelner Kamerazeilen ganze Matrizen, im konkreten Fall 2560 Zeilen auf einmal, aneinandergereiht werden. Die Hochdurchsatz-Mikroskopielösung wird durch eine selbst entwickelte Software auf Basis von NI LabVIEW gesteuert und ist auf einem inversen Forschungsmikroskop vom Typ Nikon Ti-E implementiert.

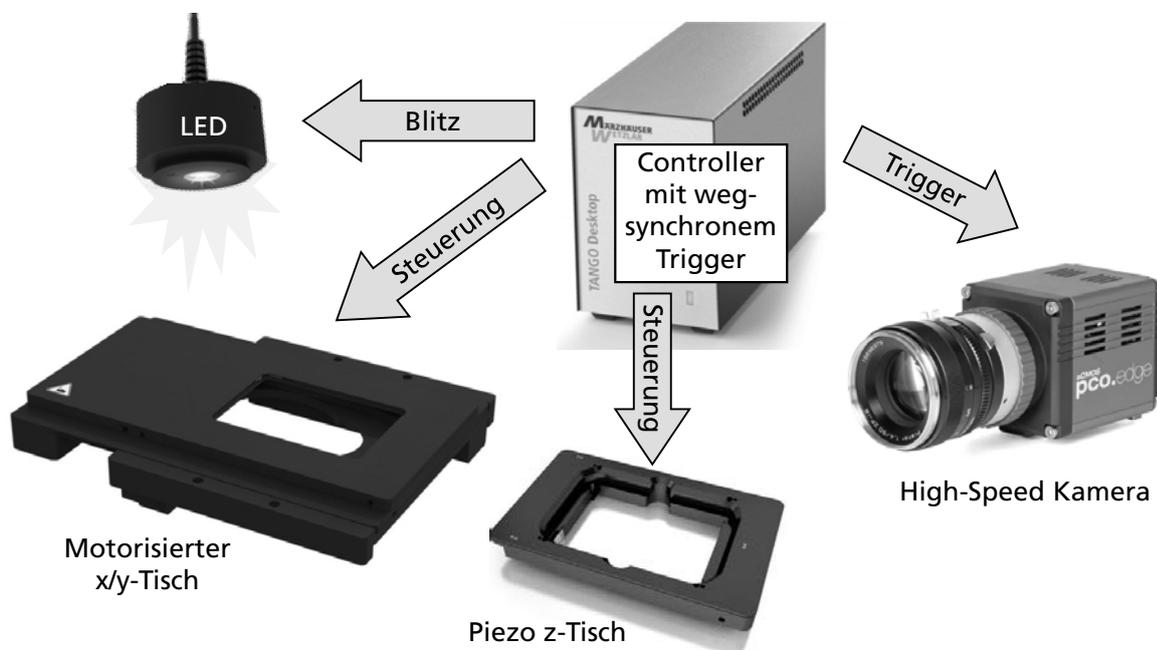


Bild 3: Synchronisierte Hardware-Komponenten zum kontinuierlichen Mikroskopieren

Um eine ausreichend kurze Belichtungszeit zu realisieren und damit Bewegungsunschärfe zu vermeiden, wird eine LED-basierte Blitzbeleuchtung im μs -Bereich eingesetzt. Die hohen Bildraten werden mittels einer Highspeed-Kamera mit einem sehr großen $4/3''$ sCMOS Bildsensor (pco.edge) aufgezeichnet. Die anfallenden Datenraten von bis zu 540 MB/s werden über eine leistungsfähige Schnittstelle (Dual Camera-Link) auf einen Rechner übertragen, wo sie temporär im Arbeitsspeicher (Kapazität 24 GB) zwischengepuffert werden. Die erreichbaren 50 fps ergeben sich durch den Betriebsmodus der Kamera. Die Kamera wird im sogenannten Pseudo Global Shutter Modus betrieben, der intern dem Rolling Shutter Modus entspricht. Im Gegensatz zum Rolling Shutter Modus kommt es bei dieser Betriebsart nicht zu Rolling Shutter Artefakten, die aufgrund zeitlich versetzter Belichtung der Kamerazeilen normalerweise auftreten.

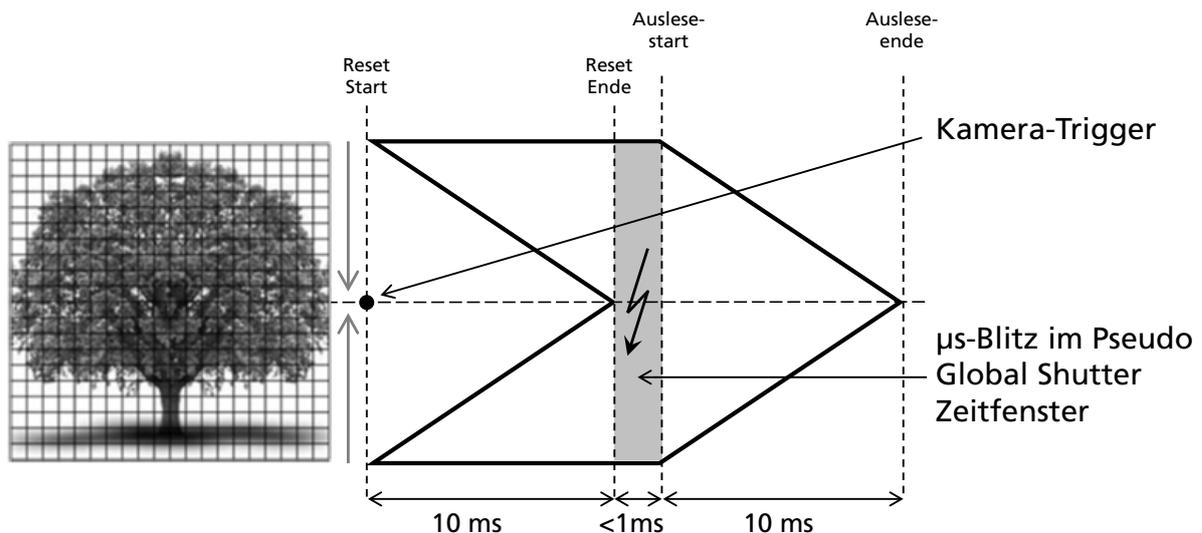


Bild 4: Synchronisation zwischen Kamera- und Blitz-Trigger im Pseudo Global Shutter Modus

Der Blitz setzt zeitlich verzögert zum Kameratrigger ein und die Belichtung findet erst statt, sobald alle Zeilen geöffnet sind. Dies ist beim Pixelclock von 286 MHz nach 10 ms der Fall. In diesem Zeitfenster erfolgt nun der einige Mikrosekunden kurze Blitz. Für den Verschluss des Sensors werden weitere 10 ms benötigt, sodass die Zykluszeit 20 ms zuzüglich der Blitzdauer entspricht. Die Framerate liegt damit bei knapp unterhalb von 50 fps. Unter Berücksichtigung

der Verarbeitungsgeschwindigkeit der LabVIEW Software wird eine maximale Bildrate von 48 fps erreicht.

2.2 Fokusproblematik

Aufgrund der geringen Schärfentiefe bei Mikroskopobjektiven und den mikroskopischen Unebenheiten der meisten Proben ist es in der Regel notwendig, den Fokus mehrfach nachzustellen. Auch bei spritzgegossenen Zellkulturgefäßen wie Mikrotiterplatten aus Kunststoff ist der Plattenboden, auf dem die adhären-ten Zellen wachsen, niemals komplett eben. Höhenabweichungen der Zellebene von bis zu 200 μm aufgrund von Unebenheiten und Dickenabweichungen des Plattenbodens sind nicht ungewöhnlich. Dies übersteigt den Schärfentiefebereich selbst eines 4x Mikroskopobjektivs. Insofern ist ein ständiges Nachfokussieren beim Mikroskopieren von Standard-Mikrotiterplatten unabdingbar. Aus diesem Grund verfügt das System über die Möglichkeit, die Probe während des kontinuierlichen Scans nicht nur in x- und y-Richtung, sondern auch in z-Richtung zu verfahren. Dies geschieht durch einen Piezotisch, der die gesamte Probe in einem Verfahrbereich von 300 μm bis zu 25 Mal pro Sekunde bewegt und damit eine schnellen Fokusanpassung auf bis zu jedem zweiten Bild bei maximaler Bildrate ermöglicht. Die Messung der Fokuspositionen erfolgt über einen bildverarbeitungs-basierten Autofokusalgorithmus, der die Bildschärfe bei unterschiedlichen Arbeitsabständen an mehreren Stützstellen nach dem Kriterium der normalisierten Varianz auswertet [5]. Durch Interpolation wird aus den Stützstellen eine vollständige Höhenkarte erzeugt, die die Abweichungen der Zellebene berücksichtigt. Im anschließenden kontinuierlichen Scan werden diese Höheninformationen berücksichtigt und ausgeglichen, sodass die Mikrotiterplatten nicht nur schnell, sondern auch exakt fokussiert mikroskopiert werden.

3 Zusammenfassung

Das vorgestellte Mikroskopieverfahren reduziert die Aufnahmedauer bei Durchlichtanwendungen beträchtlich, da eine deutlich höhere Bildrate infolge verkürzter Positionierzeiten erreicht werden kann. Dies ist dem Konzept zu verdanken, dass die Probe aus der Bewegung heraus ohne anzuhalten belichtet

wird. Davon profitieren insbesondere große Proben wie Zellkulturgefäße. Neben der Phasenkontrastmikroskopie von Zellen auf diese Art und Weise kann die entwickelte Hochdurchsatzmikroskopie aber auch in anderen Bereichen wie der Materialwissenschaft oder der Qualitätskontrolle im Halbleiterbereich ganz neue Möglichkeiten eröffnen.

Literatur

- [1] Rankov, Vladan; Locke, Rosalind J.; Edens, Richard J.; Barber, Paul R.; Vojnovic, Borivoj: An algorithm for image stitching and blending, Proceedings of SPIE – Volume 5701, Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XII, S. 190-199, Conchello, Jose-Angel; Cogswell, Carol J.; Wilson, Tony (Hrsg.), 2005, DOI: 10.1117/12.590536.
- [2] Marx, Ulrich; Schenk, Friedrich; Behrens, Jan; Meyr, Ulrike; Wanek, Paul; Zang, Werner; Schmitt, Robert; Brüstle, Oliver; Zenke, Martin; Klocke, Fritz: Automatic Production of Induced Pluripotent Stem Cells, Procedia CIRP, Volume 5, S. 2-6, 2013, DOI: 10.1016/j.procir.2013.01.001.
- [3] Ziel2.NRW Projekt, www.stemcellfactory.de, 2014.
- [4] Schenk, Friedrich; Schmitt, Robert: High-Speed Microscopy – Scanning of microtiter plates at unprecedented speed, Imaging and Microscopy 16, 1, S. 20-22, 2014.
- [5] Sun, Yu; Duthaler, Stefan; Nelson, Bradley J.: Autofocusing in computer microscopy: Selecting the optimal focus algorithm, Microsc. Res. Tech. 65 (3), S. 139–149, 2004, DOI: 10.1002/jemt.20118.