



Lock-in imager for time-resolved fluorescence imaging with europium.

IMMS has developed a lock-in imager chip for time-resolved fluorescence imaging with europium and integrated it into an example application for digital readout of strip tests. The picture shows the demonstrator. Photo: IMMS.

Motivation and overview

In in-vitro diagnostics, the labeling of target analytes with fluorescent dyes is becoming increasingly common, as they can be easily distinguished from background and interfering signals. In the MEDIKIT project, IMMS has developed a lock-in imager chip for time-resolved fluorescence imaging with europium and integrated it into an example application for digital readout of test strips. Those tests, also called lateral flow assays (LFA), play an important role in in-vitro diagnostics. They are cost-effective, easy to handle and therefore perfectly suited for decentralised and time-critical diagnostics. They are widely used as pregnancy or COVID-19 rapid tests, among others, to make qualitative conclusions (positive or negative). However, quantitative information on concentrations and ratios are needed for many diagnostic questions. Common LFA reader combinations with classical dye particles such as gold are not sensitive enough for this purpose. New LFA reader combinations with europium markers offer much higher readout sensitivities, which are supported by our imager. Thanks to its lock-in principle, elaborate optical filters can be omitted.

*More on
MEDIKIT at
www.imms.de*

Annual report

© IMMS 2020

The imager chip developed at IMMS uses time-resolved fluorescence to detect the concentration of biomarkers using molecular biological and immunological assays developed by our project partners Senova and Oncgnostics. The biomarkers bind fluorophores (such as europium in the example application with test strips) and these are excited with light of specific wavelengths. As a result, they emit photons of longer wavelengths, which are detected by the chip. In conventional fluorescence measurements, excitation and emission light are separated by optical filters. In time-resolved fluorescence measurement, the emission is detected only after the excitation light has decayed. Excitation and emission light are separated by their different temporal decay properties, cf. figure 1.

If the excitation light is switched off, its intensity falls within a few nanoseconds far below that of the fluorescent light of europium, which has decay times of several hundred microseconds. With the new image sensor of IMMS, the excitation light can be faded out in time and the fluorescence light is collected over several illumination cycles. This enables a very high sensitivity as well as a cost-effective system design for point-of-care diagnostic systems. Furthermore, the image sensor can also be used to directly measure the temporal decay curves, so that different fluorescent dyes can be simultaneously distinguished from each other, thus enabling multiparameter diagnostics.

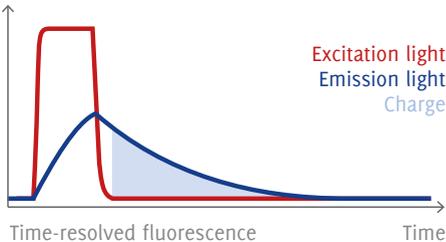


Figure 1:

Different temporal decay properties of excitation and emission light. The area under the blue curve corresponds to the charge of the emission light relevant for measurement.

Diagram: IMMS.

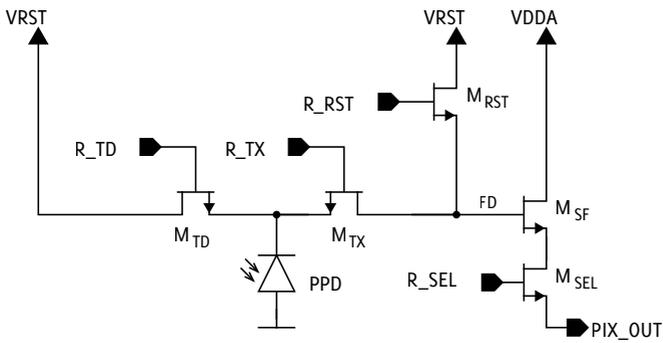


Figure 2:

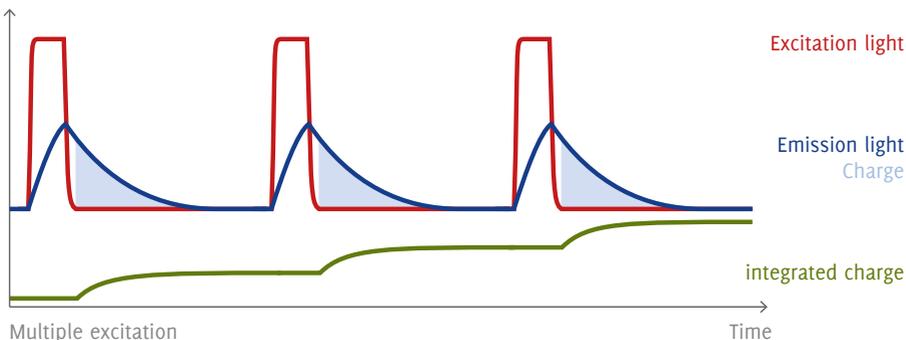
Simplified circuit schematic of the lock-in pixel.

Diagram: IMMS.

Image sensor lock-in principle

The image sensor is made up of pixels that operate based on the lock-in principle, cf. figure 2. This means that the photodiode (PPD), as a light-sensitive element in the pixel, contains several rapidly switchable taps (M_{TX} , M_{TD}) to separate the charge carriers generated by the incident light into different temporal components. As soon as the fluorescent dyes are excited by a light pulse, the excitation light can be largely suppressed by an appropriate pixel configuration (M_{TD} conductive). Once it has decayed, the tap in the pixel is switched (M_{TX} conductive) and the emission light that is supposed to be measured can be collected (accumulation takes place on the capacitance of node FD) until it has also decayed. This sequence can be repeated several times, cf. Figure 3. The signal components originating from the fluorescence emission light are accumulated cycle by cycle, thus amplifying the output signal. Subsequently, the accumulated charges in the pixel array are digitally converted row by row (using M_{RST} , M_{SF} , and M_{SEL}), and the image data is transmitted at the end of the capturing cycle.

Figure 3: Once the excitation light has decayed, the emitted fluorescence light is measured until it has also decayed. This can be repeated several times. The fluorescence emission light is accumulated cycle by cycle, increasing the output signal. Diagram: IMMS.



Excitation light

Emission light Charge

integrated charge

Multiple excitation

Time

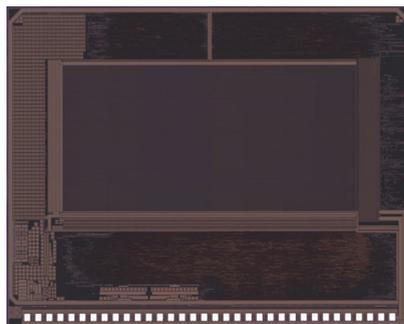
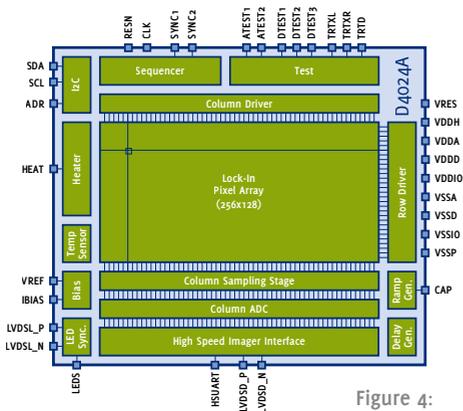


Figure 4: left: block diagram; right: chip photo. Diagram/photo: IMMS.

Chip architecture

The image sensor shown in Figure 4 has a resolution of 256 x 128 pixels with a pixel size of 10 μm x 10 μm . This enables a variety of diagnostic applications, such as readout of LFA or direct spotting of DNA probes. Apart from the actual image array, the sensor also contains a single-slope analog-to-digital converter for the image data, a programmable sequencer for highly flexible control of the complete image acquisition process, an I²C interface for chip configuration and an analog temperature sensor.

Demonstrator

Based on the IvD rapid prototyping platform of IMMS, a demonstrator was developed for application-oriented evaluation of the new image sensor. The platform is housed in a 3D-printed case together with a pulsed light source for excitation of the fluorescent dyes, cf. Figure 5. The demonstrator provides a WLAN interface for wireless

More on this platform in this report.



Figure 5:

Demonstrator for the application-oriented evaluation of the new image sensor with the IvD rapid prototyping platform of IMMS. This is all built into the housing along with a pulsed light source to excite the fluorescent dyes.

Photograph: IMMS.

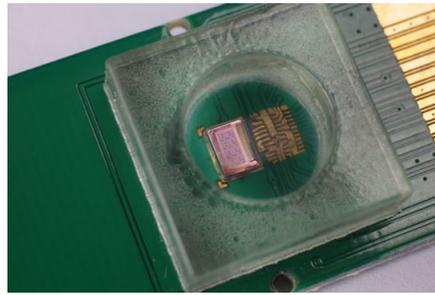
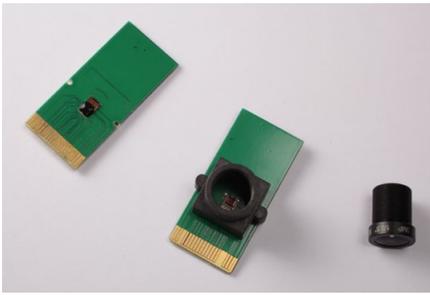


Figure 6: left: Cartridge with lens for readout of LFA; right: fluidic cartridge with cavity and bio-compatible encapsulated sensor chip for molecular biology detection taking place directly on the chip surface. Photograph: IMMS.

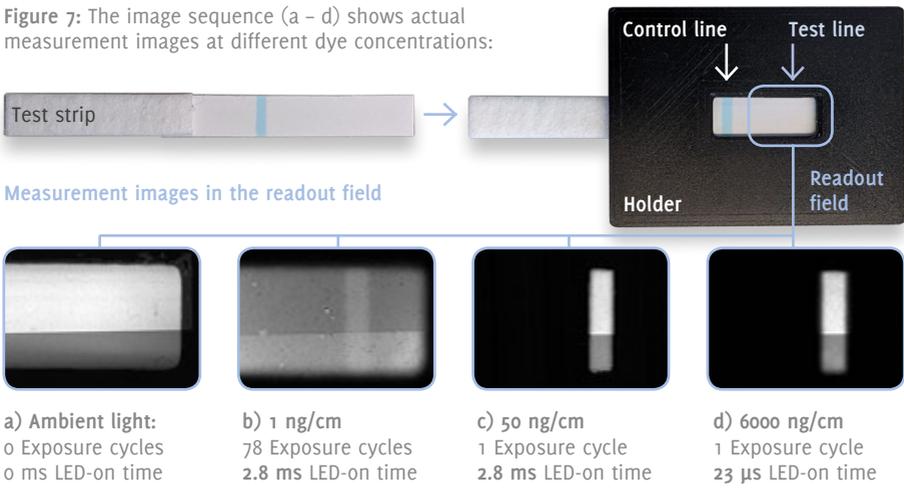
configuration of the sensor and image readout, through which the user interacts with the chip via a web browser.

The image sensor can be mounted on an application-specific cartridge that is plugged into the demonstrator. Two types were developed for this purpose in the MEDIKIT project: A cartridge with a lens for reading LFA and a fluidic cartridge with a cavity and a biocompatibly encapsulated sensor chip for molecular biological detection, which takes place directly on the chip surface, see Figure 6.

Evaluation

The LFA reader application works with an europium-based fluorescent dye that is excited with UV light. For the application-oriented evaluation of the image sensor, our project partner Senova provided standardised strip tests to which europium lines were applied in a concentration series. A very wide concentration spectrum with more than 4 decades (from 0.1 – 6000 ng/cm) could be detected with the chip, cf. Figure 7. This very high dynamic range is achieved by the multiple exposure mode described above, which allows to make the very low concentrations visible and still distinguishable from the background signal.

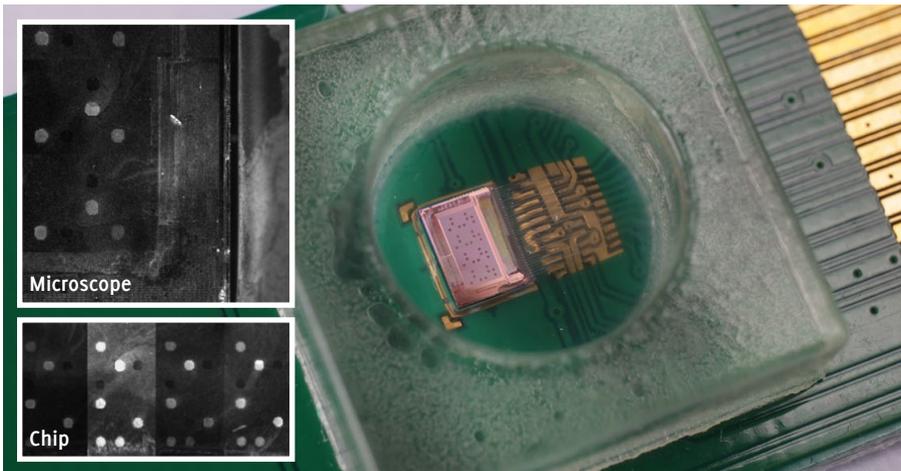
Figure 7: The image sequence (a – d) shows actual measurement images at different dye concentrations:



(a) Reference image in ambient light (*without excitation light the fluorescence line is invisible*), (b) at low concentrations (*translucent background with faint, noisy but distinct line at long exposure time and several exposure cycles*), (c) at medium concentrations (*intensive line at long exposure time*) and (d) at high concentrations (*intensive line at very short exposure time*). Photographs/Diagram: IMMS.

First promising results were also achieved with the fluidic cartridge. Our project partner oncgnostics was able to image an assay for the diagnosis of cervical cancer in the cartridge, see Figure 8. The target DNA could be clearly detected (figure 8 bottom), as the corresponding image through a fluorescence microscope (figure 8 top) shows.

Figure 8: Assay cartridge with measurement image of the lock-in imager chip (bottom left) and reference image of a fluorescence microscope (top left). Photographs: IMMS and oncgnostics.



The results from the investigations of the chip have already led to follow-up projects. In the Ovutinin* project with Senova, the chip will be adapted and further developed specifically for the LFA reader application. It will feature an adapted image array and a higher degree of integration. The goal of the project is to develop a commercial mobile LFA reader for fertility diagnostics.

The use for fluidic applications will also be further developed in the follow-up project “SensInt”. Here, a derivative of the ASIC will be developed, which is directly designed for integration into a microfluidic chip with the partners microfluidic ChipShop GmbH und Axenoll 3D Printing GmbH.

Beyond these two projects, we aim to use the lock-in imager to pave the way for other applications for which time-resolved fluorescence is the key to industrial utilisation suitable for mass production.

Contact person: Eric Schäfer, M.Sc., eric.schaefer@imms.de



The project on which these results are based was supported by the German “Land” of Thüringen and co-financed by European Union funds within the framework of the European Regional Development Fund (ERDF) under the reference 2017 FE 9044.

- > *Integrated sensor systems*
- > *Distributed measurement + test systems*
- > *Mag6D nm direct drives*
- > *Contents*
- * *Funding*

IC development services at www.imms.de

More on [MEDIKIT at www.imms.de](http://www.imms.de)



Lock-In-Mager für die zeitaufgelöste Fluoreszenzbildgebung mit Europium

Das IMMS hat einen Lock-In-Imager-Chip für die zeitaufgelöste Fluoreszenzbildgebung mit Europium entwickelt und in eine Beispielapplikation zum digitalen Auslesen von Streifen-tests integriert. Das Bild zeigt den Demonstrator. Foto: IMMS.

Motivation und Überblick

In der In-Vitro-Diagnostik werden Zielanalyten zunehmend mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, da sie sich leicht von Hintergrund- und Störsignalen unterscheiden lassen. Das IMMS hat im Projekt MEDIKIT einen Lock-In-Imager-Chip für die zeitaufgelöste Fluoreszenzbildgebung mit Europium entwickelt und in eine Beispielapplikation zum digitalen Auslesen von Streifen-tests integriert. Diese auch Lateral-Flow-Assays (LFA) genannten Tests spielen eine wichtige Rolle für die In-vitro-Diagnostik. Sie sind kostengünstig, einfach zu handhaben und daher prädestiniert für die dezentrale und zeitkritische Diagnostik. Sie sind u.a. als Schwangerschafts- oder COVID-19-Schnelltests weit verbreitet, um qualitative Aussagen (positiv oder negativ) treffen zu können. Für viele diagnostische Fragen werden jedoch quantitative Aussagen zu Konzentrationen und Verhältnissen benötigt. Gängige LFA-Reader-Kombinationen mit klassischen Farbstoffpartikeln wie Gold sind dafür nicht empfindlich genug. Neue LFA-Reader-Kombinationen mit Europium-Markern bieten weitaus höhere Ausleseempfindlichkeiten, die durch den Imager unterstützt werden. Durch dessen Lock-In-Prinzip können aufwändige optische Filter eingespart werden.

*Mehr zu
MEDIKIT auf
www.imms.de*

Jahresbericht

© IMMS 2020

Der am IMMS entwickelte Imager-Chip erfasst mit zeitaufgelöster Fluoreszenz die Konzentration von Biomarkern mit molekularbiologischen und immunologischen Assays, die von den Projektpartnern Senova und oncnostics erarbeitet wurden. Durch die Biomarker werden Fluorophore, wie Europium in der Beispielanwendung mit Streifentests, gebunden und diese werden mit Licht bestimmter Wellenlängen angeregt. Dadurch emittieren sie Photonen anderer Wellenlängen, die von dem Chip detektiert werden. Bei herkömmlichen Fluoreszenzmessungen werden Anregungs- und Emissionslicht durch optische Filter getrennt. Bei der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung wird die Emission erst erfasst, nachdem das Anregungslicht abgeklungen ist. Getrennt werden Anregungs- und Emissionslicht dabei anhand ihrer unterschiedlichen zeitlichen Abklingeigenschaften, vgl. Abbildung 1.

Schaltet man das Anregungslicht ab, fällt dessen Intensität bei Europium innerhalb von wenigen Nanosekunden weit unter die des Fluoreszenzlichts, das Abklingzeiten von mehreren hundert Mikrosekunden aufweist. Mit dem neuen Bildsensor des IMMS kann das Anregungslicht zeitlich ausgeblendet und das Fluoreszenzlicht über mehrere Beleuchtungszyklen gesammelt werden. Das ermöglicht eine sehr hohe Sensitivität sowie einen kostengünstigen Systemaufbau für Point-of-Care-Diagnosesysteme. Ferner lassen sich mit dem Bildsensor die zeitlichen Abklingkurven auch direkt messen, sodass simultan unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe voneinander unterschieden werden können und damit Multiparameterdiagnosen ermöglicht werden.

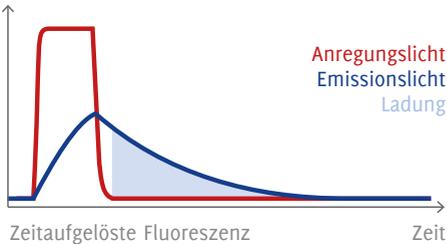


Abbildung 1:

Unterschiedliche zeitliche Abklingeigenschaften von Anregungs- und Emissionslicht. Die Fläche unter der blauen Kurve entspricht der zur Messung relevanten Ladung des Emissionslichts.

Grafik: IMMS.

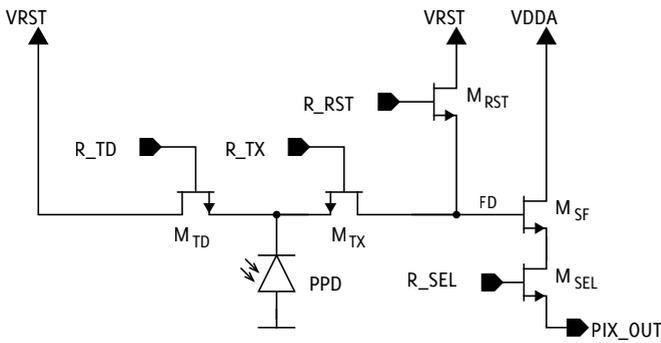


Abbildung 2:

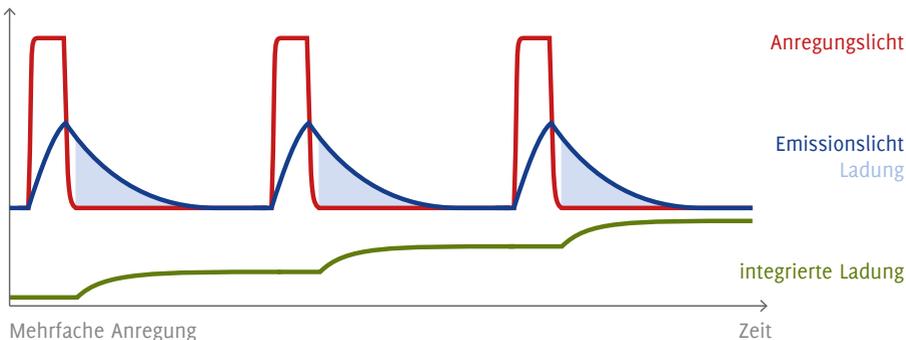
Vereinfachter Schaltplan des Lock-In-Pixels.

Grafik: IMMS.

Lock-In-Prinzip des Bildsensors

Der Bildsensor selbst ist aus Pixeln aufgebaut, die nach dem Lock-In-Prinzip arbeiten, vgl. Abbildung 2. Das bedeutet, dass die Photodiode (PPD) als lichtempfindliches Element im Pixel mehrere schnell über Transistoren umschaltbare Abgriffe (M_{TX} , M_{TD}) besitzt, um die durch den Lichteinfall erzeugten Ladungsträger zeitlich in unterschiedliche Anteile zu separieren. Wenn nun die Fluoreszenzfarbstoffe durch einen Lichtpuls angeregt werden, lässt sich durch eine entsprechende Konfiguration der Pixel das Anregungslicht größtenteils ausblenden (M_{TD} leitend). Sobald es abgeklungen ist, wird der Abgriff im Pixel umgeschaltet (M_{TX} leitend) und das eigentlich zu messende Emissionslicht kann aufgesammelt werden (Akkumulation erfolgt auf der Kapazität des Knotens FD), bis auch dieses abgeklungen ist. Diese Abfolge kann mehrfach wiederholt werden, vgl. Abbildung 3, und so die Empfindlichkeit signifikant gesteigert werden. Die Signalanteile, die vom Fluoreszenzemissionslicht stammen, werden dabei Zyklus für Zyklus akkumuliert und verstärken so das Ausgangssignal. Anschließend werden die gesammelten Ladungen im Pixelfeld zeilenweise digital gewandelt (mit Hilfe von M_{RST} , M_{SF} und M_{SEL}) und am Ende die Bilddaten übertragen.

Abbildung 3: Sobald das Anregungslicht abgeklungen ist, wird das emittierte Fluoreszenzlicht gemessen, bis auch dieses abgeklungen ist. Das kann mehrfach wiederholt werden. Das Fluoreszenzemissionslicht wird Zyklus für Zyklus akkumuliert, wodurch das Ausgangssignal verstärkt wird. Grafik: IMMS.



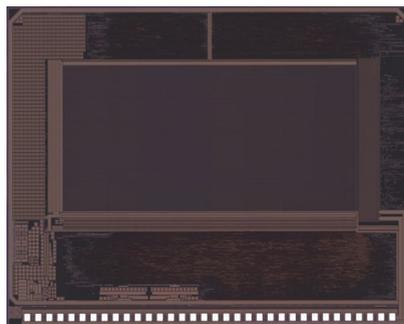
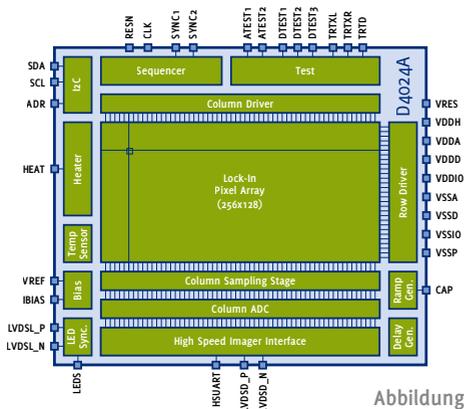


Abbildung 4:
links: Blockschaltbild, rechts: Chip-Foto. Grafik/Foto: IMMS.

Chip-Aufbau

Der in Abbildung 4 dargestellte Bildsensor hat eine Auflösung von 256 x 128 Pixeln bei einer Pixelgröße von 10 µm x 10 µm, um eine Vielzahl von diagnostischen Anwendungen realisieren zu können, wie z.B. das Auslesen von LFA oder direktes Spotting von Sonden-DNA. Neben dem eigentlichen Bildfeld enthält der Sensor weiterhin einen Single-Slope-Analog-zu-Digital-Wandler für die Bilddaten, einen programmierbaren Sequenzer zur frei konfigurierbaren Steuerung des kompletten Bildaufnahme Prozesses, eine I²C-Schnittstelle zur Chipkonfiguration und einen analogen Temperatursensor.

Demonstrator

Auf der Grundlage der IvD-Rapid-Prototyping-Plattform des IMMS wurde ein Demonstrator zur anwendungsnahen Evaluation des neuen Bildsensors entwickelt. Die Plattform ist in einem 3D-gedrucktem Gehäuse zusammen mit einer Impuls-Lichtquelle zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe untergebracht, vgl. Abbildung 5. Der Demonstrator stellt eine WLAN-Schnittstelle zur drahtlosen Konfiguration des Sensors und zur Bildauslese bereit, über die der Anwender mit dem Chip per Webbrowser interagiert.

*Mehr zur Platt-
form in diesem
Bericht.*



Abbildung 5:

Demonstrator zur anwendungsnahen Evaluation des neuen Bildsensors mit der IvD-Rapid-Prototyping-Plattform des IMMS. Diese ist im Gehäuse zusammen mit einer Impuls-Lichtquelle zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe untergebracht.

Foto: IMMS.

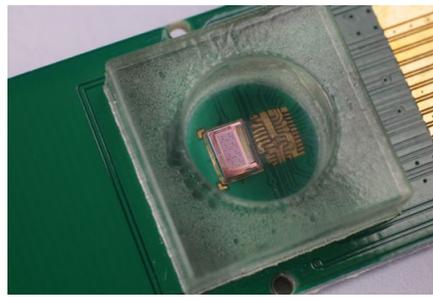
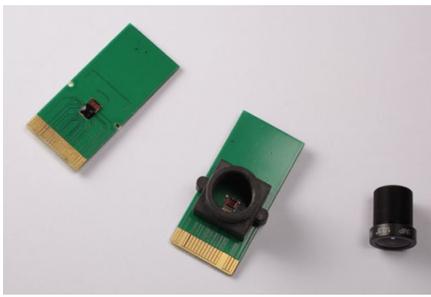


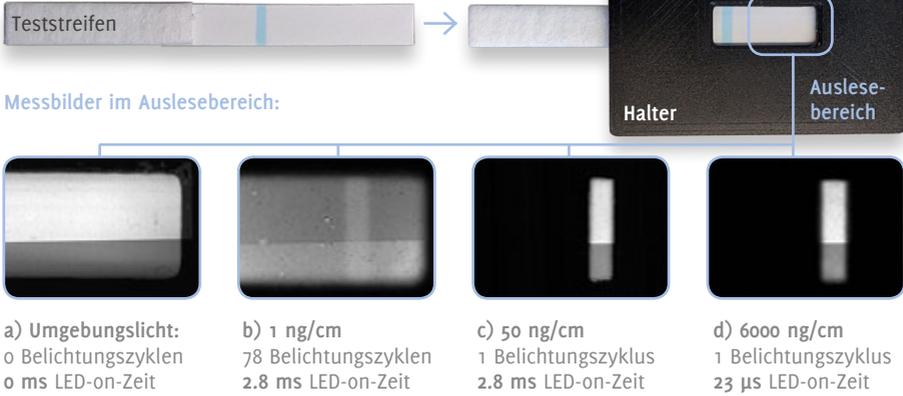
Abbildung 6: links: Cartridge mit Linse zum Auslesen von LFA; rechts: fluidische Cartridge mit Kavität und biokompatibel vergossenem Sensorchip für molekularbiologische Nachweise, die direkt auf der Chipoberfläche stattfinden. Fotos: IMMS.

Der Bildsensor kann auf eine anwendungsspezifische Cartridge aufgebaut werden, die in den Demonstrator eingesteckt wird. Im Projekt MEDIKIT wurden dafür zwei Typen entwickelt: Eine Cartridge mit Linse zum Auslesen von LFA und eine fluidische Cartridge mit Kavität und biokompatibel vergossenem Sensorchip für molekularbiologische Nachweise, die direkt auf der Chipoberfläche stattfinden, vgl. Abbildung 6.

Evaluation

Die LFA-Reader-Applikation arbeitet mit einem Europium-basierten Fluoreszenz-Farbstoff, der mit UV-Licht angeregt wird. Zur anwendungsnahen Evaluation des Bildsensors hat unser Projektpartner Senova standardisierte Streifen-tests zur Verfügung gestellt, auf welche Europium-Linien in einer Konzentrationsreihe aufgebracht wurden. Es konnte mit dem Chip ein sehr weites Konzentrationsspektrum mit über 4 Dekaden (von 0,1 – 6.000 ng/cm) nachgewiesen werden, vgl. Abbildung 7. Dieser sehr hohe Dynamikbereich wird durch den oben beschriebenen Mehrfachbelichtungsmodus erzielt, der es ermöglicht, die sehr niedrigen Konzentrationen sichtbar zu machen und noch vom Hintergrundsignal zu unterscheiden.

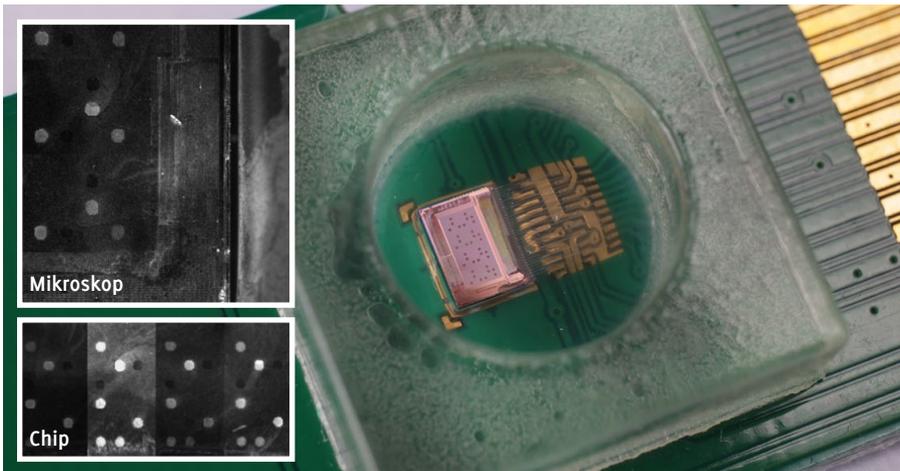
Abbildung 7: Die Bildfolge (a – d) zeigt tatsächliche Messbilder bei unterschiedlichen Europium-Konzentrationen:



(a) Referenzbild im Umgebungslicht (*ohne Anregungslicht bleibt die Fluoreszenzlinie unsichtbar*), (b) bei niedrigen Konzentrationen (*durchscheinender Hintergrund mit schwacher, verrauschter, aber deutlicher Linie bei langer Belichtungszeit und mehreren Beleuchtungszyklen*), (c) bei mittleren Konzentrationen (*intensive Linie bei langer Belichtungszeit*) und (d) bei hohen Konzentrationen (*intensive Linie bei sehr kurzer Belichtungszeit*). Fotos/Grafik: IMMS.

Auch mit der fluidischen Cartridge wurden erste vielversprechende Ergebnisse erzielt. Unser Projektpartner oncnostics konnte in der Cartridge einen Assay zur Diagnose von Gebärmutterhalskrebs abbilden, vgl. Abbildung 8. Dabei konnte die Ziel-DNA deutlich nachgewiesen werden (Abbildung 8 unten), wie die dazu entsprechende Aufnahme durch ein Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 8 oben) zeigt.

Abbildung 8: Assay-Cartridge mit Messbild des Lock-in-Imager-Chips (links unten) und Referenzbild eines Fluoreszenzmikroskops (links oben). Fotos: IMMS und oncnostics.



Die Ergebnisse aus den Untersuchungen des Chips sind bereits in Folgeprojekte gemündet. Im Projekt Ovutinin mit Senova wird der Chip speziell auf die LFA-Reader-Applikation angepasst und weiterentwickelt. Er wird sich durch ein adaptiertes Bildfeld und einen höheren Integrationsgrad auszeichnen. Ziel des Projekts ist es, einen kommerziellen mobilen LFA-Reader für die Fertilitätsdiagnostik zu entwickeln.

Auch der Einsatz für fluidische Applikationen soll im Folgeprojekt „SensInt“ weiter vertieft werden. Hier wird ein Derivat des ASICs entstehen, welches direkt für die Integration in einen Mikrofluidik-Chip mit den Partnern microfluidic ChipShop GmbH und Axenoll 3D Printing GmbH ausgelegt ist.

Über diese beiden Projekte hinaus streben wir an, mit dem Lock-In-Imager den Weg für andere Anwendungen zu ebnen, für die die zeitaufgelöste Fluoreszenz der Schlüssel zur massentauglichen, industriellen Verwertung ist.

Kontakt: Eric Schäfer, M.Sc., eric.schaefer@imms.de



Das diesen Ergebnissen zugrundeliegende Vorhaben wurde vom Freistaat Thüringen unter der Nummer 2017 FE 9044 gefördert und durch Mittel der Europäischen Union im Rahmen des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) kofinanziert. Projektpartner waren die ALS Automated Lab Solutions GmbH, oncgnostics GmbH und die Senova Gesellschaft für Biowissenschaft und Technik mbH.

- > Integrierte Sensorsysteme
- > Intelligente vernetzte Mess- u. Testsysteme
- > Mag6D-nm-Direktantriebe
- > Inhalt
- * Förderung

IC-Entwicklungsleistungen auf www.imms.de

Mehr zu [MEDIKIT auf www.imms.de](http://www.imms.de)