Chris Steinert

TopSpot Vario:
A Novel Microarrayer System for Highly Parallel Picoliter Dispensing

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Angewandte Wissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

Freiburg i. Br., Juni 2005

Dekan
Prof. Dr. Jan G. Korvink

Referenten
Prof. Dr. Roland Zengerle (Freiburg)
Prof. Dr. Jan G. Korvink (Freiburg)

Tag der Prüfung
16.01.2006

Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK)
Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung
Fakultät für Angewandte Wissenschaften
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Microfluidics & Nanofluidics

Band 3

Chris Steinert

TopSpot Vario: A Novel Microarrayer System for Highly Parallel Picoliter Dispensing

Shaker Verlag
Aachen 2008

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.

Zugl.: Freiburg, Univ., Diss., 2006

Copyright Shaker Verlag 2008
Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-7554-9
ISSN 1866-5411

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

ABSTRACT

This thesis reports about the conceptional design, development and characterization of a novel system for production of microarrays, a so called microarrayer system. In the recent years microarray technology had a high impact in basic research, diagnostics and drug discovery. Its success caused tremendous activity of different companies to provide the most suitable microarrayer system. The here presented microarrayer bases on the commercially available TopSpot technology and is called TopSpot Vario. The TopSpot technology is an alternative to the piezo tip and pin printers which are currently dominating the microarrayer market. Its main advantage is the parallel ejection of up to 96 different samples and its one to one format change from the microtiterplate ordered reservoir pattern to the microarray spot pattern. The nozzles of the system are fabricated very homogeneously and very precisely in parallel using silicon micromachining. This is a clear advantage compared to other systems using single part productions like piezo tips and pins with a wider spread of important geometries.

The novel developed TopSpot Vario system improves the standard TopSpot technology by replacing the pneumatic actuation principle by a direct liquid displacement method. This was realized by a piezoelectrically driven deformation of elastomer material into filled cavities and nozzles placed in their bottom.

Core of the TopSpot Vario technology is a silicon micromachined printhead as it is for the standard TopSpot technology. Up to 24 different samples can be filled into the reservoirs which are ordered in a standard 384 well plate pattern. The one to one format change from the 6 by 4 ordered reservoir pattern with a pitch of 4.5 mm to the 500 µm pitched microarray grid is provided by microchannels connecting each reservoir with the corresponding nozzle. During actuation a parallel ejection of small droplets, one out of each nozzle, takes place.

Different printhead designs and concepts were pursued. All components of the printhead like nozzles, displacement chambers, microchannels, etc. were separately optimized by different test-structures. For example, the optimized geometries of a via structure which connects microchannels in different levels improved the successful self-filling rate of the standardly used geometries from 62 % to 96 % for the applied test procedure. All optimized geometries were integrated into a finally used TopSpot Vario printhead design which was extensively and systematically characterized by using statistical planning of experiments. It provides an elastomer placement into the printhead before the printhead is filled. This enables a reliable sealing of all microchannels from each other during filling and actuation. Hence a reliable exclusion of cross-contamination between the samples is guaranteed. Key of success for this approach was the invention of a new microchannel structure for bubble-free priming of blind channels.

The actuation principle of TopSpot Vario allows a tunable droplet volume of aqueous solutions from 250 pl up to 1600 pl. Indeed, one major conclusion of this work was the recommendation to print multiple small droplets into each other to achieve larger spot diameters instead of ejecting only one large droplet. This was due to the measured decrease of array homogeneity with increasing droplet volume.

Compared to the standard TopSpot system, TopSpot Vario allows a much more flexible tunability of droplet volume and dynamics, a smaller minimum droplet volume (TopSpot Vario: 250 pl; standard TopSpot: ~700 pl), a higher maximum printing frequency (TopSpot Vario: 400 Hz; standard TopSpot: 30 Hz) and dispensing of higher viscous media (TopSpot Vario: $\eta < 11$ mPa·s ; standard TopSpot: $\eta < 2.4$ mPa·s). Further advantage compared to standard TopSpot is that not all nozzles of a TopSpot Vario printhead have to be used in parallel, so that even arrays with a pitch higher than 500 µm are possible. On the other hand, a pitch of 250 µm is possible on nearly all substrate surfaces due to the small minimum droplet volumes. Finally the reliable exclusion of cross-contamination during actuation is a clear advantage compared to standard TopSpot, where a blocked vent hole can result in a mixing of the samples in the actuation chamber. The finally used 24 channel printhead design can be easily enhanced to fabricate a 96 channel TopSpot Vario printhead which is already commercially available for the standard TopSpot system.

The characterization of the TopSpot Vario system showed an intra nozzle reproducibility of droplet volume of 1.9 % and an inter nozzle reproducibility of all 24 droplet volumes in one array of 7.5 % at the recommended droplet volume of 270 pl. Reproducibility of average droplet volumes of one array from experiment to experiment was measured at 5 %. With these values the TopSpot Vario system can compete with all the other state-of-the-art microarrayers.

Still to be optimized is the filling performance of the TopSpot Vario printheads. There, the main focus has to be set on minimization or even better an exclusion of the present risk of filling failures due to trapping of air bubbles in the displacement chambers. During 2040 performed fillings, 31 (1.5 %) displacement chambers with a trapped air bubble were observed. Due to the fact that even one fail filled displacement chamber results in the need of cleaning and re-filling of the entire 24 channel printhead, overall 11 % of the printhead fillings showed at least one of that filling malfunction.

The current state of development of TopSpot Vario allows the use of the presented technology for a highly flexible microarray production. It is ready for beta testing where an occasional cleaning and re-filling of the printhead due to filling failures can be tolerated.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit berichtet über die Konzeption, Entwicklung, Herstellung und Charakterisierung eines neuartigen Systems zur Herstellung von Microarrays: eines sogenannten Microarrayers. In den letzten Jahren hatte die Microarray-Technologie einen großen Einfluss auf die Grundlagenforschung, Diagnostik und Medikamentenentwicklung. Ihr großer Erfolg veranlasste mehrere Firmen einen enormen Entwicklungsaufwand zu betreiben, um geeignete Microarrayer Systeme anbieten zu können. Das in dieser Arbeit präsentierte und als TopSpot Vario bezeichnete Microarrayer System basiert auf der schon kommerziell erhältlichen TopSpot Technologie. Die TopSpot Technologie ist eine Alternative zu den "piezo tip"- und Nadeldruckern, die momentan den Microarrayer Markt dominieren. Die beiden Hauptvorteile des Systems sind die Möglichkeit bis zu 96 verschiedene Medien simultan zu dosieren und die Eins-zu-Eins Formatwandlung von der Mikrotiterplatten basierten Reservoiranordnung zu dem Spotraster des gedruckten Microarrays. Alle Düsen werden gleichzeitig durch modernste Silizium-Mikromechanik hergestellt, womit höchst präzise und gleichmäßige Geometrien ermöglicht werden. Dies ist ein klarer Vorteil gegenüber den anderen Systemen, bei welchen piezo-tips und Nadeln Einzelanfertigungen mit einer größeren Streuung der wichtigen Abmessungen sind.

Das neuentwickelte TopSpot Vario System verbessert die standard TopSpot Technologie, indem das indirekte, pneumatische Aktorprinzip durch eine direkte Flüssigkeitsverdrängung ersetzt wurde. Dies wurde durch eine piezoelektrisch angetriebene Elastomerverformung in mit Flüssigkeit gefüllte Kavitäten erreicht in deren Böden sich jeweils eine Düse befindet.

Das Herzstück der TopSpot Vario Technologie ist wie auch bei der standard TopSpot Technologie ein Druckkopf, der durch Silizium-Mikromechanik hergestellt wird. Bis zu 24 verschiedene Medien können in die, in einem 384-er Mikrotiterplattenraster angeordneten, Reservoire pipettiert werden. Die Eins-zu-Eins Formatwandlung des 6 auf 4 Gitters mit einem Abstand der Reservoire von 4,5 mm auf einen Abstand der Spots im Microarray von 500 µm wird durch Mikrokanäle ermöglicht, die jedes Reservoir mit der dazugehörigen Düse verbinden. Während des Druckens findet ein simultaner Abriss von kleinen Tropfen, einer aus jeder Düse, statt.

Unterschiedliche Druckkopfausführungen und -konzepte wurden verfolgt. Die Druckkopfkomponenten, wie z.B. Düsen, Verdrängungskammern, Mikrokanäle, usw. wurden gesondert durch unterschiedliche Teststrukturen optimiert. Zum Beispiel wurde durch die optimierte Durchkontaktierungsstruktur, die Mikrokanäle in unterschiedlichen Ebenen miteinander verbindet, im Vergleich zur standard TopSpot Struktur eine Verbesserung der Selbstbefüllung von 62 % auf 96 % während der genutzten Testprozedur erreicht. Die optimierten Komponenten wurden alle in das letztendlich genutzte TopSpot Vario Druckkopf Design integriert, welches systematisch durch Anwendung der Methoden zur statistischen Versuchsplanung charakterisiert wurde. Das genutzte Druckkopf Konzept gewährleistet eine vollständige Abdichtung der Mikrokanäle untereinander, sowohl während der Druckkopfbefüllung, als auch während des Drukkens. Somit wird eine Kreuzkontamination zwischen den Medien zuverlässig

ausgeschlossen. Der Schlüssel zum Erfolg für dieses Konzept lag in der Erfindung und Integration einer neuartigen Mikrokanalstruktur, die das blasenfreie Befüllen von abgeschlossenen Fluidkanälen ermöglicht.

Das TopSpot Vario Aktorprinzip erlaubt ein einstellbares Tropfenvolumen von wässrigen Lösungen zwischen 250 pl und 1600 pl. Allerdings ist ein wichtiges Endergebnis dieser Arbeit die Empfehlung mehrere kleine Tropfen ineinander zu drucken, um größere Spots zu erhalten, anstatt das Tropfenvolumen zu vergrößern. Begründet wurde dies durch eine gemessene Verschlechterung der Arrayhomogenität mit zunehmenden Tropfenvolumen.

Verglichen mit dem standard TopSpot System, erlaubt TopSpot Vario eine vielfach flexiblere Einstellbarkeit von Tropfenvolumen und -geschwindigkeit, ein kleineres minimales Tropfenvolumen (TopSpot Vario: 250 pl; standard TopSpot: ~700 pl), eine höhere Maximaldruckfrequenz (TopSpot Vario: 400 Hz; standard TopSpot: 30 Hz) und das Dispensieren von viskoseren Medien (TopSpot Vario: $\eta < 11$ mPa·s ; standard TopSpot: $\eta < 2.4$ mPa·s). Ein weiterer Vorteil verglichen mit dem standard TopSpot System ist die Möglichkeit auch nur wenige anstatt alle Düsen zu nutzen, was auch Microarray Raster mit einem Abstand der Spots von mehr als 500 µm erlaubt. Auf der anderen Seite erlaubt das geringe minimale Tropfenvolumen auch Microarrays mit einem Spotabstand von nur 250 µm auf fast allen Substratoberflächen. Abschließend ist der zuverlässige Ausschluss einer Kreuzkontamination der Medien während des Drukkens ein klarer Vorteil gegenüber dem standard TopSpot System, bei welchem eine verstopfte Entlüftungsbohrung eine Vermischung der Medien in der Aktorkammer hervorrufen kann. Das letztendlich genutzte 24 Kanal TopSpot Vario Druckkopfdesign kann ohne großen Aufwand zu einem Design mit 96 Kanälen erweitert werden, welches schon kommerziell verfügbar für die standard TopSpot Technologie ist.

Die Charakterisierung des TopSpot Vario Systems ergab eine Reproduzierbarkeit der Tropfenvolumina aus einer Düse von 1.9 % und eine Reproduzierbarkeit der Tropfenvolumina über alle 24 Düsen von 7.5 % für das empfohlene mittlere Tropfenvolumen von 270 pl. Die Reproduzierbarkeit des durchschnittlichen Volumens aller Tropfen eines Arrays von einem Druckexperiment zum nächsten lag bei 5 %. Mit diesen Werten kann das TopSpot Vario System mit den anderen Microarrayer Systemen auf dem Stand der Technik konkurrieren.

Noch verbessert werden muss das Befüllungsverhalten der TopSpot Vario Druckköpfe. Hierbei muss das Hauptaugenmerk auf eine Minimierung bzw. besser auf den Ausschluss des Risikos von Fehlbefüllungen auf Grund von eingeschlossenenen Luftblasen in den Verdrängungskammern gelegt werden. Während der 2040 durchgeführten Befüllungen der Verdrängungskammern wurden in 31 (1.5%) Luftblasen beobachtet. Aufgrund der Tatsache, dass schon eine fehlbefüllte Verdrängungskammer dazu führt, dass der gesamte 24 Kanal Druckkopf gereinigt und wiederbefüllt werden muss, zeigten insgesamt 11 % der Druckkopfbefüllungen mindestens einen Befüllungsfehler.

Der aktuelle Entwicklungsstatus des TopSpot Vario Systems erlaubt die Nutzung der präsentierten Technologie für eine hochflexible Herstellung von Microarrays. Das System ist bereit für die Betatestphase, in der ein gelegentliches Reinigen und Wiederbefüllen der Druckköpfe aufgrund von Fehlbefüllungen toleriert werden kann.

CONTENTS

PUBLICATIONS 1

INTRODUCTION 3

STATE-OF-THE-ART AND OUTLINE OF THE THESIS 7

3-1 STATE-OF-THE-ART 7

3-2 OUTLINE OF THE THESIS 20

FUNDAMENTALS 21

4-1 DROPLET TEAR-OFF 21

4-2 STATISTICAL PLANNING OF EXPERIMENTS 32

PRINCIPLE AND DESIGN 39

5-1 TOPSPOT VARIO PRINTHEADS 39

5-2 TOPSPOT VARIO DISPOSABLE HYBRID PRINTHEADS 43

5-3 TOPSPOT VARIO PRINT MODULES 46

FABRICATION 49

6-1 TOPSPOT VARIO PRINTHEADS 49

6-2 PDMS PROCESSING 53

6-3 TOPSPOT VARIO DISPOSABLE HYBRID PRINTHEADS 55

PRINTHEAD PRIMING 59

PRINTHEAD DESIGN OPTIMIZATION 61

8-1 OUTER PRINTHEAD DIMENSIONS, RESERVOIRS, ACTUATION CHAMBER AND MICROCHANNELS 61

8-2 VIAS 62

8-3 DISPLACEMENT CHAMBERS AND INLET CHANNELS 65

8-4 AIR OUTFLOW CHANNELS 68

8-5 NOZZLES 68

8-6 PASSIVE MICROFLUIDIC STRUCTURES 69

8-7 FINAL TOPSPOT VARIO R22 PRINTHEAD DESIGN 70

CHARACTERIZATION OF THE OPTIMIZED PRINTHEAD DESIGN 71

9-1 PARAMETERS OF INTEREST 71

9-2 MEASUREMENT METHODS 73
9-2.1 droplet volume 73
9-2.2 array homogeneity 73
9-2.3 stable operation 74
9-2.4 system failures 75
9-2.5 piezo movement, printhead deflection, elastomer prestress 76

9-3 ANALYSIS OF INFLUENCE PARAMETERS 78
9-3.1 arrangement of experimental designs 79
9-3.2 results of experimental designs 81
9-3.2.1 piezo stroke 84
9-3.2.2 elastomer hardness 85
9-3.2.3 elastomer prestress force 86
9-3.2.4 different printheads 88
9-3.2.5 summary 89
9-3.3 piezo speed 89
9-3.4 sample viscosity 90
9-3.5 printing frequency 92
9-3.6 array to array reproducibility 93
9-3.7 longtime performance 94
9-3.8 printhead filling 95
9-3.9 printhead storage time 97
9-3.10 printhead bending 98

9-4 PERFORMANCE OF TOPSPOT VARIO 99

TOPSPOT VARIO DISPOSABLE HYBRID PRINTHEAD 101

10-1 PRINTHEAD FILLING 101

10-2 PRINTING 101

CONCLUSION 103

REFERENCES 111

12-1 USED MATERIALS 118

12-2 USED DEVICES 119

ACKNOWLEDGMENTS 121