

# Klaviatur der Farben

**Multi-Laser-Geräte für die Biophotonik bieten für Mehrfarben-Anwendungen ein ideales Zusammenspiel verschiedener Anregungswellenlängen. Aufgrund der exzellenten Fokussierbarkeit und der hohen Monochromasie sind Laser für diese Anwendungen hervorragend geeignet.**

Die »Biophotonik« ist eine relativ junge Disziplin, und sie hat in den letzten Jahren ein starkes Wachstum erfahren. Der Begriff »Biophotonik« setzt sich aus den Worten »bios« (Leben) und »phos« (Licht) zusammen und beschreibt die Anwendung von lichtbasierten Techniken, um Fragen aus den Lebenswissenschaften (Life Sciences) wie Biologie oder Medizin zu untersuchen. Licht misst berührungslos und stört dabei (im Idealfall) nicht die zellulären Vorgänge. Licht ist somit ein ideales Werkzeug, um biologische Fragestellungen auf zellulärer Ebene zu analysieren und erlaubt selbst Messungen *in vivo* über große Zeiträume.

In fluoreszenzbasierten Techniken werden die zu untersuchenden zellulären Strukturen mit speziellen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die durch Licht der geeigneten Wellenlänge angeregt werden können. Die Zielstruktur erzeugt dadurch ein sehr spezifisches Signal mit hohem Kontrast. Um verschie-

dene Strukturen miteinander in Bezug zu setzen, werden diese mit verschiedenen (typischerweise drei bis vier) Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die nacheinander angeregt und gemessen werden. Für viele fluoreszenzbasierte Methoden und insbesondere für die konfokale Mikroskopie, spielt der Laser als Lichtquelle eine zunehmend bedeutendere Rolle. Aufgrund der exzellenter Fokussierbarkeit und der hohen Monochromasie sind Laser für diese Anwendungen hervorragend geeignet.

## Die bunte Welt der Biophotonik

In den vergangenen Jahren hat sich eine Reihe von laserbasierten Analysemethoden etabliert, um *in vitro* oder *in vivo* Zellen zu analysieren und zu charakterisieren. Neue Laserparameter im Bezug auf spektrale Abdeckung, Leistung und Pulsbarkeit unterstützen zudem die derzeit stattfindende rasante Entwicklung neuer Techniken im Bereich Biophotonik. Diverse Verfahren nutzen das Zusammenspiel von verschiedenen Laserwellenlängen und gegebenenfalls Pulsdauern. Insbesondere wird das breite Angebot an leistungsstarken und gut fokussierbaren Wellenlängen immer substanzieller, da eine selektive und effiziente Anregung der eingesetzten Farbstoffe eine Voraussetzung für aussagekräftige Messergebnisse ist.

Aus biologischer Sicht sind dabei vor allem Wellenlängen im sichtbaren Bereich von Interesse. Im UV-Bereich werden Zellen bereits photochemisch geschädigt, und im IR-Bereich müssen aufwändigere Detektoren verwendet werden. Die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe binden beispielsweise an



iChrome MLE mit Küvetten. Alle Abb.: Toptica

ein spezielles Makromolekül wie ein bestimmtes Protein oder an eine bestimmte Struktur, wie beispielsweise Zellkern oder Mitochondrien. Gängige Wellenlängen und Farbstoffe sind 405 nm (DAPI, Hoechst, PacificBlue, CFP), 445 nm (CFP, Cerulean), 488 nm (GFP, Alexa488, FITC, Cy2), 515 nm (YFP, Alexa514, mCitrine, Venus), 532 nm (Alexa532), 561 nm (Alexa568, Rhodamine B, TexasRed, Cy3, MitoTracker Red, TRITC, mStrawberry) oder 640 nm (Alexa647, Cy5).

Zur Beleuchtung werden in konfokalen und Weitfeld-Mikroskopen häufig Kombinationen verschiedenfarbiger Laser eingesetzt. Bislang werden hierbei meistens einzelne Laser in einer externen – derzeit noch großen und justagebedürftigen – Box überlagert und über eine Single-Mode Transportfaser in das Mikroskop gekoppelt. Ein ähnliches Szenario findet sich bei vollautomatisierten Life Science-Systemen, beispielsweise in der Flusszytometrie, der Gen-Sequenzierung und auch bei Systemen für High Throughput Screening (HTS) oder High Content Screening (HCS). Nutzer dieser Systeme favorisieren eine kompakte, wartungsfreie Lasereinheit mit möglichst vielen leistungsstarken Laserfarben und einfacher Bedienung.

## Qual der Wahl: Diodenlaser, FKL, OPSSL oder Gaslaser

Für die meisten Verfahren genügen Leistungen um die 10 bis 100 mW, und idealerweise sollte der Laser asynchron mindestens im ms-Bereich modulierbar sein, für diverse Techniken aber auch

### Die Autoren



Dr. Marion Lang ist seit 2010 Technische Marketing Managerin bei Toptica Photonics AG. Sie hat auf dem Gebiet der Biophotonik promoviert und war vorher bei einem renommierten Mikroskophersteller beschäftigt.



Dr. Thomas Renner promovierte auf dem Gebiet der Kurzpulsphysik/Physikalische Chemie und ist seit 2005 Abteilungsleiter Vertrieb, Marketing und Produktmanagement bei Toptica Photonics AG.

schneller als 150 MHz. Von großer Bedeutung ist eine perfekte Leistungsstabilität (das Rauschen, sowohl kurz- als auch langfristig, sollte unter 0,5 % liegen), sowie eine bestmögliche Fokussierbarkeit. In der Mikroskopie wird nahezu ausschließlich mit Single-Mode TEM<sub>00</sub>-Strahlen gearbeitet.

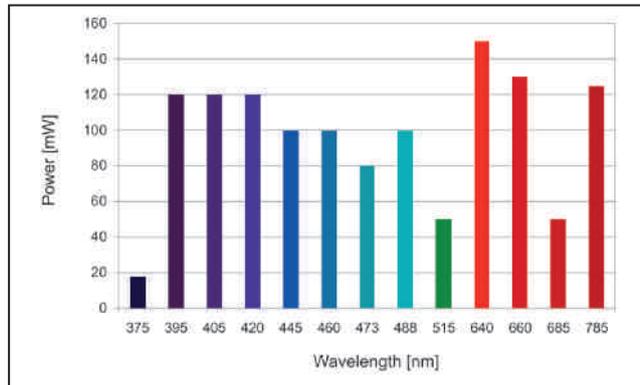
Historisch wurden vor allem Gaslaser eingesetzt – beispielsweise Argon-Laser für die Wellenlängen 364 nm, 457 nm, 488 nm und 515 nm oder Helium-Neon Laser für 543 nm und 633 nm. Zunächst waren nur diese in der Lage, eine Reihe von Wellenlängen im sichtbaren Bereich zu liefern und dabei die notwendige Strahlqualität zu erreichen. Allerdings sind Gaslaser sperrig, erzeugen eine hohe Abwärme und sind im Unterhalt kostenintensiv, so dass sie in den letzten Jahren immer mehr durch Festkörper- und Diodenlaser ersetzt werden. Inzwischen erfüllen diese ebenfalls die Anforderungen hinsichtlich spektraler Stabilität und Strahlqualität und sind zudem kompakter und einfacher zu bedienen.

In den vergangenen Jahren wurden mit frequenzkonvertierten Festkörperlasern (FKL) und optisch gepumpten Halblei-

terlasern (OPSL, Scheibenlaserprinzip) diverse Wellenlängen vor allem im Bereich zwischen Türkis und Orange/Rot mit hoher Leistung erschlossen.

Mit Diodenlasern kann der Wellenlängenbereich oberhalb von 633 nm

ist eine 515 nm Diode, ebenfalls auf GaN-Basis, die es endlich ermöglicht, diese Wellenlänge direkt, d. h. ohne Frequenzverdopplung, zu erzeugen. Die berühmte »Grün-Gelb-Lücke« ist mit dieser Entwicklung auf den Bereich



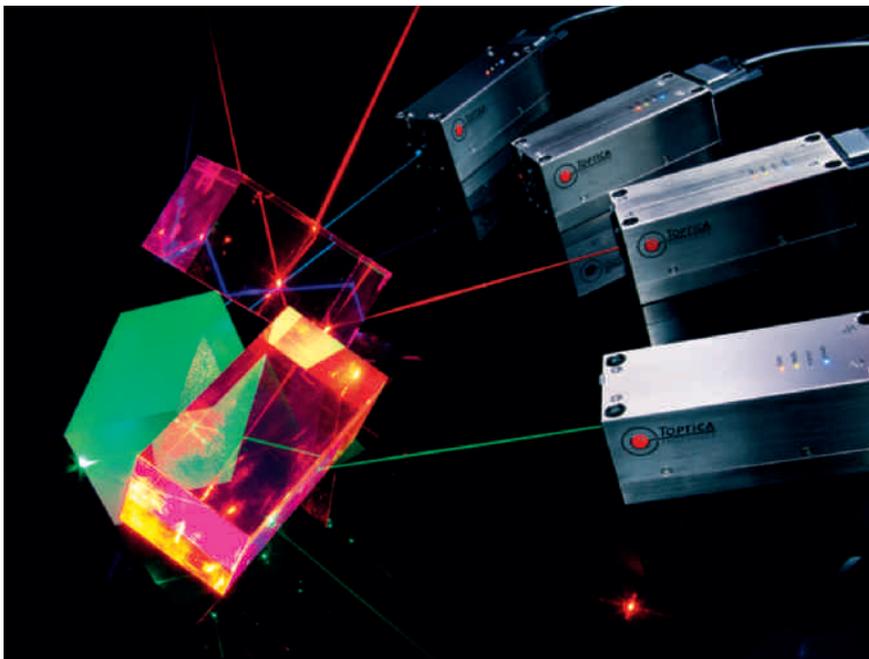
Mit bis zu 150 mW und TEM<sub>00</sub>-Strahlqualität decken die iBeam smart Laser von Toptica mittlerweile einen Großteil des benötigten Wellenlängenbereiches ab. Extra Feature: direkte Pulsbarkeit im ns-Bereich.

bereits seit Jahren hervorragend abgedeckt werden. Single Emitter Dioden auf z. B. GaAs-Basis decken diesen Bereich quasi lückenlos ab. In jüngster Zeit sind zudem im blauen Spektralbereich eine Reihe von Dioden auf GaN-Basis hinzugekommen, die den Bereich zwischen 375 nm und 488 nm mit hoher Leistung, mittlerweile quasi lückenlos, abdecken. Die jüngste Entwicklung

zwischen 515 und 633 nm geschrumpft. Zudem ist zu erwarten, dass sich insbesondere die untere Kante von derzeit 515 nm demnächst noch weiter »nach oben«, hin zu längeren Wellenlängen, bewegen wird.

Physikalisch zeichnen sich Single-Mode Diodenlaser vor allem durch ihre sehr kurze Resonatorlänge (typischerweise ca. 1 mm) sowie ihre sehr hohe Umlaufverstärkung aus. Der Auskoppelspiegel besitzt eine Reflektivität von unter 30 % und ist teilweise sogar AR-beschichtet. Dies hat zur Folge, dass die Verweildauer des Lichtes im Resonator extrem kurz ist. Als eine Konsequenz ergibt sich eine sehr kurze, longitudinale Kohärenz, welche insbesondere bei bildgebenden Verfahren, wie der Mikroskopie, einen positiven Einfluss hat (geringere Speckles). Zudem können Diodenlaser extrem schnell direkt über den Strom moduliert werden (> 200 MHz). Damit sind Pulsdauern im Nanosekundenbereich möglich. Im Bezug auf die Investitionskosten ist dies ein großer Vorteil gegenüber allen anderen Lasertypen, welche zur Intensitätsmodulation einen nachgeschalteten externen AOM oder AOTF-Schalter benötigen. Diese erlauben zudem keine asynchronen Pulse oberhalb von 10 MHz.

In modernen Life Science-Systemen wird der UV- und blaue Bereich vor allem durch Diodenlaser, der grüne und



Diodenlaser, z. B. der iBeam smart von Toptica, decken heutzutage bereits den Wellenlängenbereich zwischen 375 und 515 nm, sowie oberhalb von 633 nm mit attraktiv hohen Single-Mode Leistungen ab. Auf Wunsch auch mit COOL<sup>DC</sup> Faserkopplung.



Multi-Laser System iChrome MLE von Toptica Photonics. Bis zu vier verschiedene Laser können in einer Single-Mode Faser vereint werden.

gelbe Bereich durch FKL- und OPSL und der rote Bereich wiederum vorwiegend durch Diodenlaser (und OPSL) abgedeckt.

In der Mikroskopie ist die Anregungswellenlänge von 488 nm weit verbreitet. Interessanterweise bieten bei dieser Wellenlänge alle vier Technologien eine Lösung. Jüngst hat sich hier die Leistungssteigerung der Diodentechnologie auf über 100 mW positiv bemerkbar gemacht, so dass mittlerweile viele Anwender Diodenlaser bevorzugen. Pluspunkte sind hierbei die direkte Modulierbarkeit sowie die geringere longitudinale Kohärenz (dies reduziert die Speckles); die transversale Kohärenz bleibt nach wie vor bei TEM<sub>00</sub>-Qualität erhalten).

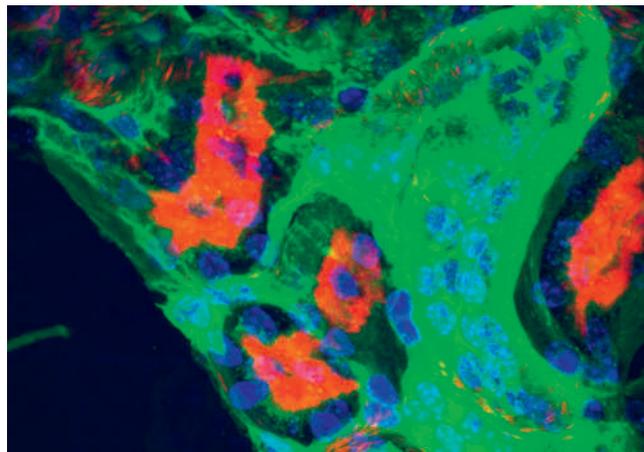
### Strom rein – Licht raus

Bislang wurden in Mikroskopen, Flusszytometern und anderen Life Science-Instrumenten die verschiedenen Laser einzeln eingebaut und separat angesteuert. Die Laserstrahlen wurden mit Hilfe eines anfälligen Justagemechanismus überlagert, welcher regelmäßig nachjustiert werden muss.

Im Zuge immer komplexerer Experimente soll die Komplexität aus dem Laseraufbau genommen werden. Dazu sollen die einzelnen Laser, die zudem oftmals von unterschiedlichen Herstellern stammen und daher auch unterschiedlich angesteuert werden müssen, ersetzt werden.

Als kompakte und stabile Alternative bieten sich Multi-Laser Systeme an, bei-

spielsweise die iChrome MLE. In diesen Systemen sind die einzelnen Laser integriert, und die verschiedenen Wellenlängen werden durch eine einzige Faser in das Endgerät eingekoppelt. Unabhängig von der Art der eingebauten Laser, bekommt der Endkunde bei diesen Systemen auch nur noch eine einzige, genormte Schnittstelle geboten, so dass



Der Schnitt einer Mäuseniere wurde mit drei verschiedenen Farbstoffen (DAPI, Alexa 488 und Alexa 568) gefärbt. Das Bild wurde mit der iChrome MLE am iMIC Mikroskop (TILL Photonics) aufgenommen.

er mit »Strom rein – Triggersignal an« die jeweils gewünschte Leistung für alle Wellenlängen erhält.

Zu diesem Zweck werden die verschiedenfarbigen Dioden- und/oder FKL/OPSL-Laser in ein gemeinsames Gehäuse integriert und mittels dichroitischen Strahlteilern exakt in einem gemeinsamen Strahl kollinear überlagert. Diese Überlagerung muss so präzise erfolgen, dass alle Laser durch die gleiche – nur wenige µm dick – Single-Mode-Faser geführt werden können und eine konstante Ausgangsleistung nach der Faser erzielt wird.

Dies muss auch unter schwankenden

Umgebungstemperaturen oder nach einem Transport des Systems noch der Fall sein.

### COOL – kalibriert konstante Laserausgangsleistung

Insbesondere die langzeitstabile Strahlüberlagerung, die ohne Nachjustage gewährleistet sein soll, stellt hohe Herausforderungen an die mittlerweile zahlreichen Anbieter von Multi-Laser Systemen.

Hierbei genügt es nicht nur, die dichroitische Strahlüberlagerung mechanisch »einzufrieren«, sondern der komplette Strahlengang, sowie die sehr sensitive Single-Mode Faserkopplung müssen gegenüber thermischen Schwankungen und mechanischen Erschütterungen geschützt werden.

Toptica verwendet für die iChrome MLE ein spezielles opto-mechanisches

Prinzip. Alle mechanischen Justageelemente sind intrinsisch extrem stabil gegenüber Vibrationen und Stößen sowie Temperaturschwankungen, können aber bei Bedarf durch einen Auto-Calibration-modus (AC-Option) elektronisch feinjustiert werden.

Dadurch wird eine konstante Ausgangsleistung für alle Wellenlängen nach der Faser gewährleistet – auf Englisch: Constant Optical Output Level. Einfach COOL.

### KONTAKT

Toptica Photonics AG  
www.toptica.com