

Multilinien-DPSS-Laser – Grundlagen und Anwendungen in Bioanalytik und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie

Håkan Karlsson, Jenni Nordborg, Cobolt AB, Stockholm, SE

Dag von Gegerfelt, von Gegerfelt Photonics, Bensheim

Mårten Stjernström, Fredrik Laurell, Hjalmar Brismar, KTH – Kungliga Tekniska högskolan, Stockholm, SE

Die Verwendung von Festkörper- statt Gaslasern als Anregungsquellen in bioanalytischen Instrumenten hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Anwendungen wie die Durchfluss-Zytometrie, konfokale Mikroskopie und DNA-Sequenzierung, die auf Fluoreszenzmessung und -abbildung beruhen, profitieren von der geringen Baugröße, niedrigen Leistungsaufnahme und hohen Stabilität von Festkörperlasern. Der folgende Beitrag skizziert die Technik von Multilinien-DPSS-Lasern (diode pumped solid-state) und illustriert dies mit einer typischen experimentellen Anwendung in der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie.

Es sind mittlerweile verschiedene Technologien kommerziell verfügbar, die Wellenlängen nahe der 488nm-Linie des Argon-Ionenlasers generieren: diodengepumpte Festkörperlaser und optisch oder elektrisch gepumpte Halbleiterlaser in Kombination mit Frequenz-wandelnden Elementen oder mit Upconversion-Faserlasern. Sie alle erzeugen Laserlicht mit ähnlichen optischen Eigenschaften und sind geeignet, die 488nm-Linie luftgekühlter Ar-Ionenlaser zu ersetzen. Zusätzlich sind seit einigen Jahren 532nm-Festkörperlaser etablierte Strahlquellen zur Anregung im Grünen (sie ersetzen die 514 nm des Ar-Ionenlasers oder die 543 nm des HeNe-Lasers), und es gibt auch Festkörperlaser als Alternative zu den blauen Linien des Ar-Ionenlasers (457 nm und 473 nm statt 458 nm und 476 nm). Darüber hinaus kann die gelb-grüne Linie des Kr-Lasers inzwischen mit einem Festkörperlaser ersetzt werden: 561 nm statt 568 nm (s. **Bild 1** und **Tabelle 1**).

Nichts desto trotz sind Festkörperlaser mit den gewünschten Eigenschaften (niedriges Rauschen, Stabilität, Strahlqualität) typischerweise teurer als Gaslaser, und sie haben nicht deren Multilinien-Fähigkeit. Daraus resultieren relativ hohe Kosten zur Ausrüstung eines Systems mit mehreren Festkörperlaser-Linien. Außerdem bringt das Einkoppeln mehrerer separater Strah-

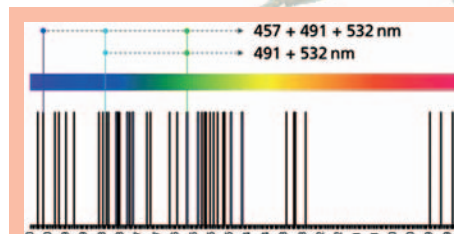


Bild 1: Beispiele zugänglicher Wellenlängen aus Summenfrequenzzeugung (SFG) und Frequenzverdopplung (SHG) der fundamentalen Linien konventioneller Seltenerd-dotierter Laserkristalle

Grundwellenlängen	SHG und SFG Oberwellen			
908	454	496	538	561
914	457	497	540	584
938	463	501	541	588
946	469	502	542	589
1047	473	504	544	594
1064	486	511	546	659
1123	488	513	548	665
1319	490	523	551	671
1342	491	527	552	
	495	532	555	

Tabelle 1: Wellenlängen-Liste zu Bild 1

len in einen gemeinsamen Strahl über Spiegelsysteme oder mehrere Faserkoppler auch noch erhebliche Komplexität mit sich. Dies sind die Hauptgründe dafür, dass Gaslaser noch immer die größeren Marktanteile im Bereich der bioanalytischen Geräte haben, zumal die Multilinien-Fähigkeit der Anregungsquelle mit der Forderung nach Multifluoreszenzmarkierung zunehmend wichtig wird.

1 Technisches Konzept

Eine neuartige Lasertechnik zielt auf die Überwindung dieser Nachteile von Festkörperlasern. Ihr technische Ansatz basiert

auf der gleichzeitigen Frequenzverdopplung (second harmonic generation, SHG) und Summenfrequenzzeugung (sum-frequency generation, SFG) der Emission zweier diodengepumpter Festkörperlaser in periodisch gepoltem KTP (Kaliumtitanylphosphat, KTiOPO_4). Der KTP-Kristall ist ein optisch nichtlineares Material, das häufig zur Frequenzverdopplung der infraroten Emission Nd-dotierter Laserkristalle eingesetzt wird. Periodisch gepolter KTP (PPKTP) ist ein maßgeschneidertes optisch nichtlineares Material, das die Quasi-Phasen-anpassung (QPM) der wechselwirkenden optischen Felder erlaubt. Eine solche QPM-Konfiguration ermöglicht die Erzeugung

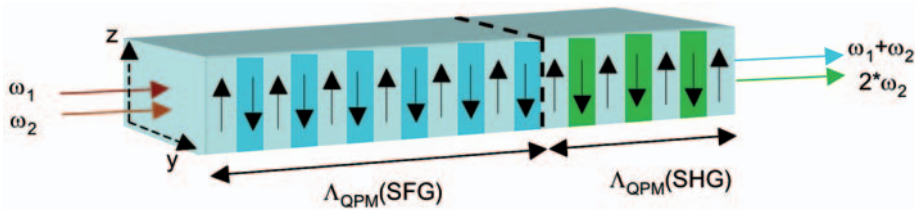


Bild 2: Multiliniemission durch Frequenzkonversion in PPKTP: Sequenzen ferroelektrischer Domänen-Gitter wurden durch elektrische Feldpolung in den KTP-Kristall eingebracht. Jedes Gitter hat eine Periode, die zur Quasi-Phasenanpassung der in den SFG- oder SHG-Prozessen wechselwirkenden Wellen geeignet ist. Alle Wellen breiten sich entlang der x-Achse des Kristalls aus, mit linearer Polarisation entlang der z-Achse des Kristalls

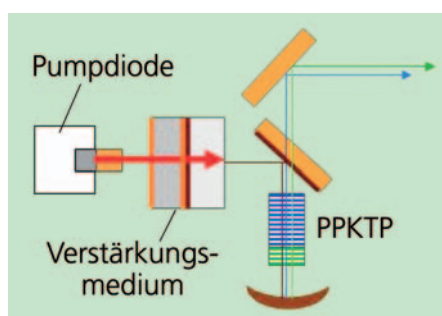


Bild 3: Aufbauschema eines Multiliniem-Festkörperlaser

beliebiger Wellenlängen innerhalb des Transparenzbereichs des Materials, wobei gleichzeitig alle wechselwirkenden Felder den gleichen linearen Polarisationszustand einnehmen.

Die QPM-Gitterstruktur wird erzeugt, indem elektrische Hochspannungspulse an einen Kristall angelegt werden, der zuvor (in konventioneller photolithographischer Technik) mit periodisch angeordneten Elektroden versehen wurde. Dies führt zu einem periodischen Wechsel der Ausrichtung des internen ferroelektrischen Feldes im Kristall. Der periodisch gepolte Kristall ist eine Schlüsselkomponente im Konzept von Multiliniem-Lasern. Es ist möglich, in einem einzigen Kristall mehrere Frequenzkonversionsprozesse zu erreichen, indem mehrere in Ausbreitungsrichtung aufeinander

folgende QPM-Gitter installiert werden, jedes mit einer anderen Gitterperiode (**Bild 2**). Dies ermöglicht die simultane Emission mehrerer sichtbarer Wellenlängen in einem einzigen Strahl. Die Verwendung von zwei oder mehr Gittern im gleichen Kristall minimiert auch die Anzahl optischer Grenzflächen und reduziert die Aufbaukomplexität des Lasers sowie seine Herstellungskosten.

Als Verstärkungsmaterialien werden Seltenerd-dotierte Kristalle wie Nd:YAG oder Nd:YVO₄ verwendet, die mit normalen kantenemittierenden Breitstreifen-Laserdioden gepumpt werden können. Diese gut verfügbaren Verstärkungsmaterialien haben eine sehr hohe Qualität und sind durch hohe Effizienz und hohe Laser-Zerstörschwellen charakterisiert, was eine relativ einfache Leistungsskalierung ermöglicht. Die IR-Strahlung der verschiedenen Verstärkungsmaterialien wird im PPKTP-Kristall kombiniert, der innerhalb des Laserresonators platziert ist, um die hohe Intensität des Feldes auszunutzen, das im Inneren der Kavität zirkuliert. Dadurch wird die Effizienz des Frequenzkonversionsprozesses gesteigert. Die Verstärkungsmaterialien lassen sich durch eine einzige Diode pumpen, so dass Lasergröße und Herstellungskosten minimal bleiben. Räumlicher Überlapp und parallele Ausbreitung der sichtbaren Strahlen ergeben sich aus der Verwendung der 1064 nm-Grund-



Bild 4: Links: Strahlprofil des Cobolt Dual Calypso. Der TEM₀₀-Strahl mit >95% Rundheit enthält beide Wellenlängen. Oben: Die zwei Wellenlängen, separiert durch einen dichroitischen Spiegel

welle sowohl für den SHG- als auch den SFG-Prozess (**Bild 3**). Stabile Resonatoren sorgen für transversal einmodige (TEM₀₀) Strahlqualität. Außerdem gewährleisten die festen Energieniveaus der Seltenerd-dotierten Kristalle hohe Präzision in den Ausgangswellenlängen und sehr saubere spektrale Eigenschaften.

Dieses technische Konzept wurde im Cobolt Dual Calypso Laser implementiert, der 20+20 mW bei 491 nm und 532 nm emittiert. Die 491nm-Linie wird durch Summenfrequenzgebung aus der 914nm-Emission eines Nd:YVO₄-Lasers und der 1064nm-Linie eines Nd:YAG-Lasers generiert. Gleichzeitig wird die 532nm-Linie durch Frequenzverdopplung der verbleibenden 1064nm-Strahlung erzeugt (**Bild 4**). Es besteht die Möglichkeit, auch eine 457nm-Linie aus der selben Laserkavität durch Frequenzverdopplung der 914nm-Emission hinzuzufügen, so dass sich ein Dreiliniem-Laser ergibt.

2 Experimentelle Ergebnisse

Um die Eignung eines diodengepumpten Doppelliniem-Festkörperlaser als direkter Ersatz für Ar-Ionenlasern in Fluoreszenz-Bilderfassungssystemen zu demonstrieren, wurde ein Dual Calypso ohne weitere Vor-

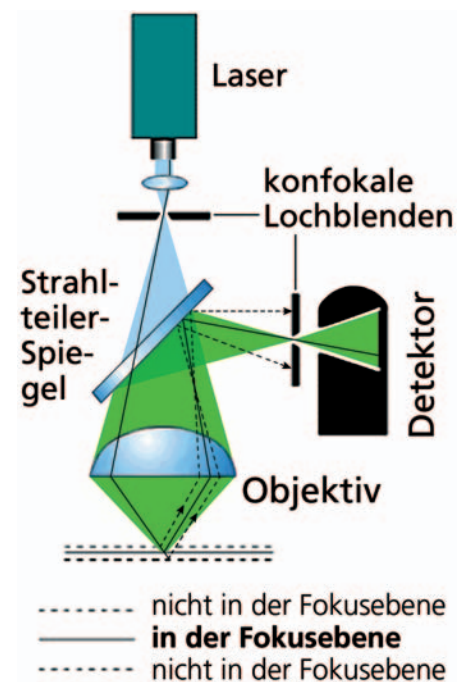


Bild 5: Prinzip eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (CLSM). Die Laser-Lochblende begrenzt den Fokus des Anregungslichts im Wesentlichen auf die Fokusebene. Fluoreszenzlicht, das unter oder über dieser Ebene emittiert wird (gestrichelte Linie) wird von der Detektor-Lochblende blockiert

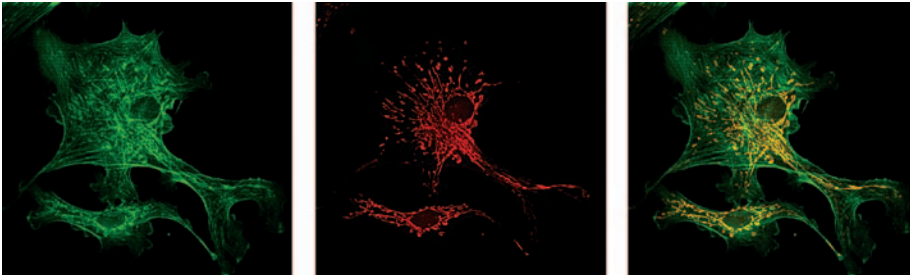


Bild 6: CLSM-Aufnahmen bei 491+532 nm von Endothel-Zellen einer Rinder-Lungenarterie. Links: F-Aktin-Filamente, grün markiert mit Bodipy FL Phalloidin, angeregt bei 491 nm, primäre dichroitische Separation bei 510 nm, Hochpass-Detektion bei 520 nm. Mitte: Mitochondrien, rot markiert mit MitoTracker Red CMXRos, angeregt bei 532 nm, primäre dichroitische Separation bei 560 nm, Hochpass-Detektion bei 570 nm. Rechts: kombiniertes rot-grünes Bild

kehrungen in ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM) Zeiss 410 integriert (**Bild 5**), das normalerweise mit Ar-Ionen- und HeNe-Lasern ausgerüstet ist. Die konfokale laserinduzierte Fluoreszenz kann zur hochempfindlichen Detektion selbst-fluoreszierender oder Fluoreszenz-markierter Biomoleküle eingesetzt werden. Mit einem CLSM gelingt die hochaufgelöste dreidimensionale Lokalisation und Identifikation von markierten Biomolekülen und selbst von physiologischen Funktionen lebender Zellen.

Die Anregungsenergien der Festkörper-Laserlinien wurden individuell auf das gleiche Niveau wie bei den Gaslasern angepasst. Hierzu dienten ein variabler Abschwächer (Newport 925B) und Neutralfilter. Dies erlaubte einen direkten Vergleich von Fluoreszenzbildern, die mit den Gaslasern und dem Doppellinien-Festkörperlaser bei gleichen Anregungsintensitäten erfasst wurden. Die von der Probe emittierte Fluoreszenz wurde spektral mit Hilfe der dichroitischen Spiegel und Emissionsfilter abgespalten, die im CLSM vorhanden sind.

Zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit des Cobolt Dual Calypso im CLSM wurde eine Referenzprobe fluoreszenzmarkierter Zellen (FluoCells, Molecular Probes) verwendet. Diese Referenzprobe ist mit den Fluoro-

phoren Bodipy FL Phalloidin und MitoTracker Red CMXRos markiert. Die erhaltenen Aufnahmen (**Bild 6**) mit generierter roter und grüner Emission der fluoreszierenden Probe zeigen deutlich die eingefärbten F-Aktin-Filamente (grün) und Mitochondrien (rot). Da der Laser kolineare duale Emission aus einem einzigen Laserkopf bietet, ist die komplexe Strahlausrichtung überflüssig, die benötigt wird, wenn verschiedene Lasers eingesetzt werden. Die erzeugten konfokalen Bilder belegen, dass Multifluoreszenzmarkierung basierend auf spektral genauer Unterscheidung mit einem Multilinen-Festkörperlaser nicht nur möglich ist, sondern – im Vergleich zu konventionellen Kombinationen von Gaslasern – Bilder der gleichen oder sogar höherer Qualität ergibt.

3 Fazit

Diodengepumpte Festkörperlaser mit Multilinen-Emission, guter Rauschcharakteristik und Langzeitstabilität sind attraktive Laserquellen für die konfokale Mikroskopie und andere fluoreszenzbasierte bioanalytische Geräte, wie in der Durchfluss-Zytometrie oder der molekularen Bildgebung.

Übersetzung: J. Kuppe

Literaturhinweise:

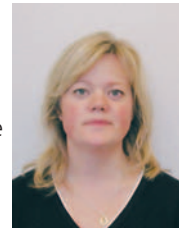
- [1] H. Karlsson, F. Laurell, *Electric field poling of flux grown KTiOPO₄*, Appl. Phys. Lett. 71 (24), 3474 (1997)
- [2] V. Pasiskevicius, S. Wang, J. A. Tellefsen, F. Laurell, H. Karlsson, *Efficient Nd:YAG laser frequency doubling with periodically poled KTP*, Appl. Optics 37 (30), 7116 (1998)

Ansprechpartner:

Dr. Håkan Karlsson
Technische Leitung und
Geschäftsentwicklung
Cobolt AB
Kräftriket 8
SE-10405 Stockholm,
Schweden
Tel. +46/8/5459-1233
Fax +46/8/5459-1231
eMail: hakan.karlsson@cobolt.se
Internet: www.cobolt.se



Dr. Jenni Nordborg
Marketing und Vertrieb
Tel. +46/8/5459-1230
eMail:
jenni.nordborg@cobolt.se



Dag von Gegerfelt
Geschäftsführer
von Gegerfelt Photonics
Berliner Ring 161 D
D-64625 Bensheim
Tel. 06251/85679-84
Fax 06251/85679-85
eMail:
dvg@vongegerfeltphotonics.com
Internet:
www.vongegerfeltphotonics.com



www.photonik.de ▶ Webcode 6008