

# Laser im Fokus der optischen Mikroskopie

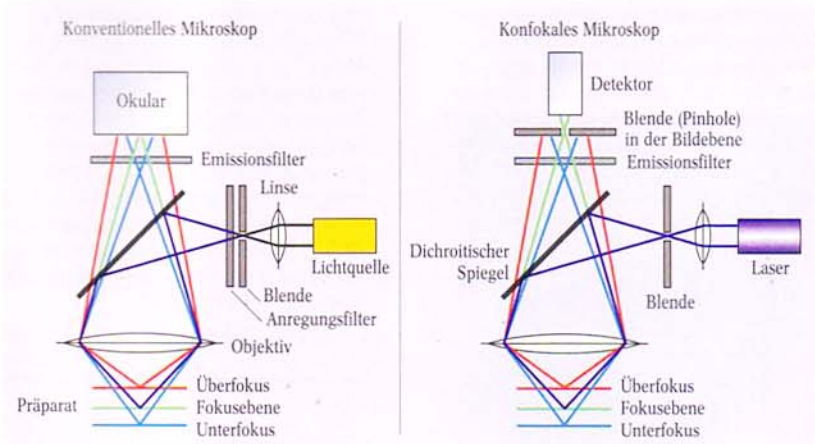
Frank Lison, Anselm Deninger und Wilhelm Kaenders

Die Lasertechnik wird aus gutem Grund als Querschnittstechnologie bezeichnet. Am Beispiel des „guten alten Mikroskops“ sieht man, wie modernste physikalische Ansätze über die einzigartigen Eigenschaften des Lasers ihren Weg bis zum Anwender finden. Dieser Artikel beleuchtet exemplarisch aktuelle Mikroskopietechniken anhand von Laserentwicklungen, wie sie die Autoren in den letzten Jahren durchgeführt haben.

Im Unterschied zur klassischen Lichtmikroskopie, in der für die überwiegende Zahl von Untersuchungen noch traditionelle, inkohärente Lichtquellen eingesetzt werden, dominiert in der konfokalen Mikroskopie längst der Laser. Obschon Minsky im ersten konfokalen Mikroskop aus der zweiten Hälfte der fünfziger Jahre noch eine Zirkonium-Bogenlampe als Lichtquelle verwendet hat,<sup>1)</sup> sind die derzeit erhältlichen Geräte ohne integrierte Laserquellen nicht mehr vorstellbar. Aktuelle Weiterentwicklungen wie zum Beispiel die Mehrphotonenmikroskopie, 4Pi-Mikroskopie oder zeitaufgelöste Mikroskopie gehen folglich einher mit der Bereitstellung der entsprechenden Laserquellen als robuste integrierbare Systeme. Was für den Biologen zerstörungsfreie Echtzeit-Messung an lebenden Zellen heißt, wird aus Sicht des Laserphysikers zur Weiterentwicklung im Spannungsfeld zwischen möglichst guter Zeit- und dreidimensionaler Ortsauflösung (in vivo), verbunden mit einer spektralen Diskriminierung der zu untersuchenden Teil-Objekte. Die Optimierung des Signal-zu-Rauschverhältnisses für eines dieser Ziele wird dabei oft mit einem entsprechenden Nachteil in einem anderen Bereich erkauft.

In einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop tastet der fokussierte Laserstrahl einzelne Punkte sowohl auf der Oberfläche als auch im Innern der Probe ab und regt dort Fluoreszenz an, die nachfolgend von der Optik wieder aufgefangen wird. Nach spektraler und räumlicher Filterung wird dieses Fluoreszenzlicht detektiert und hieraus mittels geeigneter Algorithmen eine zwei- oder dreidimensionale Ansicht der Probe generiert (Abb. 1). Die klassische konfokale Mikroskopie benötigt eine intensitätsstabile Lichtquelle hoher Brillanz. Die ersten Generationen kommerzieller konfokaler Mikroskope waren durchweg mit Gaslasern, insbesondere He-Ne-, Argon- und HeCd-Lasern, ausgestattet. Hiermit verbunden waren Probleme durch Temperatur- und Alterungseffekte, die zu Strahlwanderung sowie zur Erwärmung der Umgebung aufgrund mangelnder elektrischer Effizienz der Laser führten. Die beiden letztgenannten Lasertypen besaßen zudem nur eine recht begrenzte Lebensdauer (weniger als 5000 Stunden für HeCd-Laser).

Mit der Weiterentwicklung der Halbleiter- und Festkörperlaser hat sich in den vergangenen Jahren das Bild deutlich gewan-



**Abb. 1:** Links: konventionelles Mikroskop, rechts: konfokales Mikroskop. Das Anregungslicht wird durch eine erste Blende hindurch fokussiert. Das nachfolgende Objektiv bildet die Lichtquelle scharf auf dem Präparat ab und fokussiert das reflektierte Licht oder Fluoreszenzlicht zum Detektor hin. Im rechts gezeigten Schema beschränkt eine zweite, in der Bildebene platzierte Blende das Sichtfeld auf einen Punkt. Die beiden Blenden

delt. Insbesondere die im Jahr 1999 von der japanischen Firma Nichia erstmalig kommerziell präsentierten violetten Halbleiterlaser eröffneten die Möglichkeit, den interessanten Wellenlängenbereich um 400 nm durch eine kostengünstige, kompakte und effiziente Laserquelle der Mikroskopie zugänglich zu machen. Inzwischen bieten nahezu alle namhaften Mikroskophersteller zumindest einen Diodenlaser bei 405 nm an. Die aktuelle Weiterentwicklung der Halbleiterlaser im ultravioletten und blauen Spektralbereich ermöglicht sogar eine Erweiterung des Einsatzbereichs auf die Wellenlängen 375, 440 und 475 nm.

Die Fertigung der „blauen“ Mikroskopie-Laser in hohen Stückzahlen erforderte seitens der Laserhersteller zahlreiche neue Konzepte für optische Komponenten, Elektronik und Temperaturmanagement. So ist es nun beispielsweise möglich, die Abhängigkeit von Laserleistung und Wellenlänge von der Temperatur der Laserdiode durch geschicktes optisches Design und integrierte Temperierung und Leistungsstabilisierung zu kompensieren. Das gewonnene Know-how lässt sich auch auf Diodenlaser im roten Spektralbereich übertragen (Abb. 2). Diese Laser bieten, nach vielen Jahren vergeblichen Bemühens, erstmals eine leistungsstarke, kompakte und sehr effiziente Alternative zu He-Ne-Lasern und Kryptonlasern, mit der Einschränkung, dass aufgrund von Lebensdauerproblemen des Halbleitermaterials der Bereich unterhalb von 640 nm nur mit reduzierter Leistung zugänglich ist. Auch gilt weiterhin, dass die aktuell bekannte Entwicklung in der Halbleitertechnik für die kommenden Jahre nur

sowie ein Punkt des Präparats sind somit konfokal und auf dem Detektor ergibt sich ein maximales Signal. Für Objekte vor oder hinter der Fokusebene (roter bzw. blauer Strahl) wird die detektierte Intensität hingegen durch die zweite Blende stark reduziert. Durch punktweises Abtasten des Präparats lässt sich eine dreidimensionale Topografie aufnehmen.

einen nichtlinearen Zugang zum Wellenlängenfenster von 500 bis 650 nm erwarten lässt. Hinsichtlich Preisvorteil und Spezifikation (z. B. Intensitätsrauschen) sind Lasersysteme mit nachgeschalteter Frequenzkonversion den traditionellen Gaslasern für die Mikroskopie ( $P < 50$  mW) inzwischen jedoch überlegen.

Die Verbindung von Laser und Mikroskop lässt sich sowohl im Freistrahl-Aufbau als auch über eine faseroptische Ankopplung realisieren. Letzteres ermöglicht eine räumliche Entkopplung von Laserbox und Mikroskop und sorgt bei Verwendung von Single-mode-Glasfasern zudem für eine Bereinigung des Strahlprofils. Bei entsprechender Aufbereitung der Strahlen lassen sich auch mit Halbleiterlasern Koppel-effizienzen von 80 % und mehr in Single-mode-Glasfasern erzielen.

Mit der Verfügbarkeit von geeigneten Halbleiterlasern für die konfokale Mikroskopie wird auch deren Einsatz in der klassischen, nicht konfokalen Mikroskopie zunehmend attraktiver. Aufgrund der derzeit noch hohen Stückkosten und der geringen spektralen Breite bleiben bislang allerdings spezielle Fluoreszenz-Techniken vorbehalten, die unmittelbar von einer intensiven monochromatischen Anregung oder der Möglichkeit einer Impulsanregung im Pikosekundenbereich profitieren. Gepulste Halbleiterlaser kommen insbesondere bei der zeitaufgelösten Spektroskopie zum Einsatz. Hierbei werden spezielle Markersubstanzen, sog. Fluorophore, in die Probe eingebracht, durch einen kurzen Lichtimpuls angeregt und anschließend wird das Abklingen der Fluoreszenzemission mit schnellen Detek-

1) M. Minsky, (1961), Microscopy apparatus. Patent US 3013467, eingereicht 1957

Dr. Frank Lison, Dr. Anselm Deninger, Dr. Wilhelm Kaenders, TOPTICA Photonics, Gräfelfing

toren ausgewertet. Durch die spezifische Lebensdauer unterschiedlicher Fluorophore ergibt sich eine Möglichkeit zur Differenzierung. Kommerziell erhältliche gepulste Halbleiterlaser erreichen Pulsspitzenleistungen von einigen 100 mW bei Impulsdauern um 100 ps und decken den Spektralbereich um 375 nm, 405 nm, 440 nm, 475 nm und oberhalb von 630 nm ab. Durch den Einsatz von Halbleiterverstärkern mit anschließender Frequenzverdopplung lässt sich neuerdings ein Teil der spektral bislang nicht zugänglichen Bereiche durchaus erschließen.<sup>2)</sup> Dazu werden Pikosekunden-Halbleiterlaser bei der doppelten Wellenlänge, also im nahinfraroten Bereich, zunächst auf Pulsspitzenleistungen von mehr als zehn Watt verstärkt und anschließend in geeigneten nichtlinearen Kristallen im einfachen Durchgang frequenzverdoppelt. Mit derartigen Lasersystemen lässt sich aktuell der gesamte Wellenlängenbereich von 390 nm bis hinauf zu 540 nm mit Pikosekunden-Laserquellen bedienen. Noch kürzere Pulse von einigen hundert Femtosekunden werden in zunehmendem Maße für die nicht-resonante Mehrphotonenanregung von Fluorophoren eingesetzt. Hierbei absorbieren die Markerstoffe bei einer Wellenlänge im Bereich von 700 bis 1200 nm zwei oder mehrere Photonen gleichzeitig; die Fluoreszenz wird untergrundfrei bei einer deutlich kürzeren Wellenlänge detektiert.

In den allermeisten Anwendungen der Laser-Mikroskopie werden intrinsisch kohärente Laserquellen ausschließlich für inkohärente Beleuchtung oder als konzentrierte Wärmequelle eingesetzt. Es gibt jedoch eine stetig wachsende Anzahl von weitergehenden Entwicklungen, die auf den besonderen Eigenschaften des Laserlichts – zeitlicher und räumlicher Kohärenz oder einem speziellen spektralen Profil – beruhen. Hierzu zählen die Integration spektroskopischer Techniken in die optische Mikroskopie, wie beispielsweise die Raman-Mikroskopie, oder Methoden zur Auflösungssteigerung, wie 4Pi- oder STED-Mikroskopie (stimulated emission depletion). Beim letzteren Verfahren, entwickelt von Stefan Hell und Mitarbeitern am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen,<sup>3)</sup> werden Farbstoffmoleküle durch einen ersten Lichtpuls angeregt und kurz darauf von einem zweiten stimulierenden Lichtpuls wieder abgeregt. Das Strahlprofil des abregenden Lichtpulses wird dabei ringförmig um den Anregungsfokus angeordnet, sodass die Moleküle in der Mitte des Rings hiervon unberührt bleiben und das nachfolgend detektierte Fluoreszenzlicht nur noch aus dem kleinen inneren Bereich stammt, dessen Größe deutlich unterhalb des Beugungslimits der konventionellen Mikroskopie liegen kann. Mittlerweile ist es der Göttinger Gruppe gelungen, durch eine Kombination von 4Pi- und STED-Mikroskopie die Auflösung bis auf 50 nm zu steigern, und theoretisch sollten sich sogar 10 nm erreichen lassen.

Bei der konfokalen Raman-Mikroskopie hingegen kombiniert man ein Raman-Spektrometer mit einem konfokalen Mikroskop, um Spektren aus einem scharf begrenzten Volumen zu analysieren. Bei der Raman-Spektroskopie treffen Photonen aus dem Anregungslicht auf ein Molekül oder Kristallgitter und erfahren mit einer geringen

Wahrscheinlichkeit ( $10^{-6}$ ) eine charakteristische Energieverschiebung. Das gestreute Licht wird gefiltert, um den Beitrag elastisch gestreuter Photonen zu eliminieren, und anschließend spektral zerlegt. Die Analyse der auftretenden Wellenlängen liefert dann qualitative wie quantitative Informationen über die Zusammensetzung der untersuchten Probe. Der Betrag der Energieverschiebung zwischen einfallendem und gestreutem Licht wird durch die angeregte Molekülschwingung vorgegeben (z. B. C-H-Streckschwingung, CH<sub>2</sub>-Deformationsschwingung). Jede Signa-

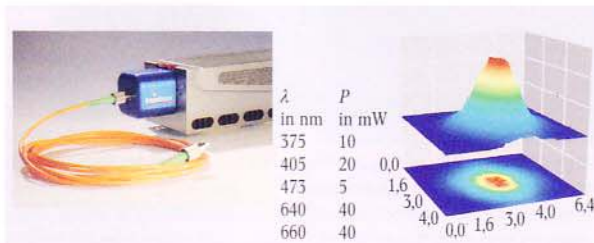


Abb. 2: Kompakte Diodenlasermodule für die Laser-Mikroskopie (links) decken einen weiten spektralen Bereich ab (Tabelle). Der Ausgangsstrahl besitzt eine Wellenfront mit einem nahezu perfekten Gauß-Profil (rechts) und kann somit beugungsbegrenzt fokussiert werden.

tur des Raman-Spektrums rührt von einer bestimmten chemischen Bindung her und liefert somit Informationen zur Struktur und Dynamik der Probe. Die Ortsauflösung für die Raman-Mikroskopie ist dabei durch die beugungsbegrenzte Fokussierung des Laserstrahls bestimmt, wird aber neuerdings auch mit Elektronenstrahlverfahren kombiniert. Die Technologie ist mittlerweile der reinen Grundlagenforschung entwachsen und kommt bei der Bestimmung von Mikrostrukturen, beispielsweise in der Qualitätsanalyse keramischer Schichten, zum Einsatz. Auch bei optischen Beschichtungen – etwa in Aufdampf- oder Sputteranlagen – lassen sich strukturelle Veränderungen schädigungsfrei nachweisen. Auf der langen Liste der mehr oder weniger alltäglichen Einsatzgebiete steht neben der Überwachung der Biergärung oder der Beobachtung des Aushärtens von Kleber auch die Analyse von Rückständen von Fasern und Druckfarben in der Gerichtsmedizin sowie die Untersuchung archäologischer Fundstücke. So lässt sich beispielsweise bei Artefakten aus der Steinzeit nicht nur die Art des Gesteins, sondern oftmals zudem seine geografische Herkunft bestimmen.

Eine andere aktuelle Anwendung, die die Kohärenz der Laser wesentlich voraussetzt, ist die Optische Kohärenztomographie (OCT). OCT erzeugt hochauflösende Querschnittsbilder von internen Mikrostrukturen in lebendem Gewebe. In transparenten Umgebungen sind Eindringtiefen im Zentimeterbereich realisierbar. Wesentliche Anforderungen an die benötigte Lichtquelle sind eine kurze zeitliche Kohärenz, wie sie spektral breitbandige Impulse mitbringen, und für Untersuchungen an biologischen Proben zudem eine Wellenlänge im Bereich hoher Transparenz. Diese findet sich insbesondere im NIR-Spektralbereich zwischen 1200 und 1800 nm. Derartige spektral breitbandige Impulse lassen sich unter Ausnutzung von nichtlinearen Prozessen mit Femtosekundenlasern erzeugen.

Zurzeit erfordert die Mikroskopie für verschiedene Anwendungen ein ganzes Arsenal speziell zugeschnittener Laserlichtquellen. Für zukünftige Geräte wäre es durchaus interessant, möglichst viele dieser Anforderungen mit einem einzigen kompakten Lasersys-

tem abzudecken. Ein großer Schritt in diese Richtung wurde im vergangenen Jahr erzielt (Abb. 3). Die Basis bildet ein Femtosekunden-Faserszillator im infraroten Spektralbereich (1550 nm), dessen Lichtimpulse anschließend kohärent nachverstärkt werden und so eine mittlere Ausgangsleistung von 200 mW bei einer Pulsdauer von 100 fs erreichen. Durch nachfolgende nichtlineare Prozesse lässt sich aus einer Laserquelle innerhalb von Sekunden eine abstimmbare Ausgangsstrahlung von einigen Milliwatt im gesamten Spektralbereich von 500 nm bis zu 780 nm erzeugen,

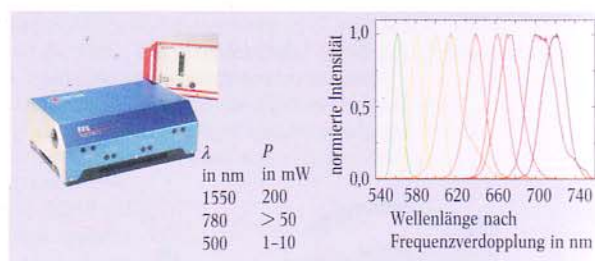


Abb. 3: Femtosekunden-Faserlaser (links) bieten eine hohe Ausgangsleistung über einen weiten Spektralbereich (Tabelle). Durch Ausnutzung nichtlinearer Effekte lässt sich das frequenzverdoppelte Ausgangsspektrum über nahezu 500 nm im sichtbaren und nah-infraroten Spektralbereich durchstimmen (rechts).

bei Bedarf sogar mit zwei spektral verschiedenen, unabhängig voneinander wählbaren und lichtphasenstarken Ausgängen. Die intensive Strahlung bei 1550 nm oder alternativ bei 780 nm (bis zu 100 mW) erlaubt zu guter letzt einen direkten Einsatz dieses Lasers für die Mehrphotonenanregung.<sup>4)</sup>

Für einen Laserphysiker stellen sich Mikroskopie und Spektroskopie noch immer als herausfordernde und spannende Anwendungsgebiete dar. Schon heute findet sich eine Vielzahl von hochaktuellen Themen aus den unterschiedlichsten Bereichen der Physik in der Mikroskopie wieder. Beispielsweise werden quantenstatistische Korrelationsmessungen in der Fluoreszenz einzelner Farbstoffmoleküle bereits bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt. Auch zukünftig wird die Entwicklung in diesen Bereichen eng mit dem Fortgang der Laserentwicklung und ihrer kommerziellen Umsetzung verknüpft bleiben. Man darf durchaus gespannt sein, welchen Einfluss aktuelle Forschungsgebiete wie optisch gepumpte Halbleiterlaser oder der erwähnte Faserlaser auf zukünftige Entwicklungen haben werden. Voraussetzung für den Erfolg neuartiger Laserentwicklungen ist sowohl ein frühzeitiger Kontakt zwischen führenden Forschungseinrichtungen und Industriepartnern als auch ein multidisziplinäres Team von Entwicklern aus den Bereichen Laserphysik, Optik, Mechanik und Elektronik, die alle gern mal über den Tellerrand schauen – hören Sie dazu?

2) [www.picoquant.de](http://www.picoquant.de)

3) [www.mpibpc.gwdg.de/groups/hell/](http://www.mpibpc.gwdg.de/groups/hell/)

4) [www.toptica.com](http://www.toptica.com) | [www.femtofiber.com](http://www.femtofiber.com)