

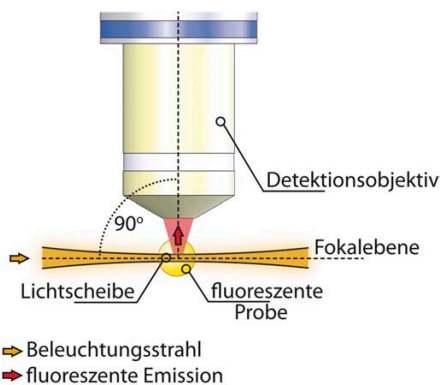
# Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie (SPIM) und Laser-Anregung in orange zur Abbildung lebender Organismen

Uros Krzic, Stefan Günther, Lars Hufnagel, EMBL, Heidelberg  
 Dag von Gegerfelt, von Gegerfelt Photonics, Bensheim  
 Håkan Karlsson, Elizabeth Illy, Jonas Hellström, Cobolt AB, Stockholm, Schweden

Lichtstreuung und Autofluoreszenz beeinträchtigen die Beobachtung biologischer Prozesse tief im Gewebe. Geeignete fluoreszente Proteine reduzieren diese probenspezifischen Einflüsse bei passenden Anregungswellenlängen. Insbesondere für die in-toto-Abbildung von sich entwickelnden Organismen wurden in den letzten Jahren helle rote Fluorophore entwickelt, die im orange-rotem Bereich anzuregen sind [1,2], also mit Laserwellenlängen von 580–600 nm. Wir zeigen hier die Anwendung eines neuen 594 nm DPSS-Lasers zur dreidimensionalen in-vivo-Beobachtung der mitotischen Zellzyklen in der Fruchtfliege.

## 1 Laser für die Fluoreszenzmikroskopie

Eine bisher in der Fluoreszenzmikroskopie weit verbreitet genutzte Anregungswellenlänge ist z.B. 561 nm (gelb). Da größere Wellenlängen mit entsprechend geringerer Photonenenergie aber weniger stark in biologischem Gewebe absorbiert werden, kann man mit einer Wellenlänge von 594 nm deutlich tiefer liegende Zellschichten in den Organismen anregen. Außerdem zeigt das von den relevanten Farbstoffen emittierte Licht wesentlich geringere Streuung und Absorption, und es tritt oft auch weniger Autofluoreszenz auf, was zu einer höheren Bildgebungsqualität führt.

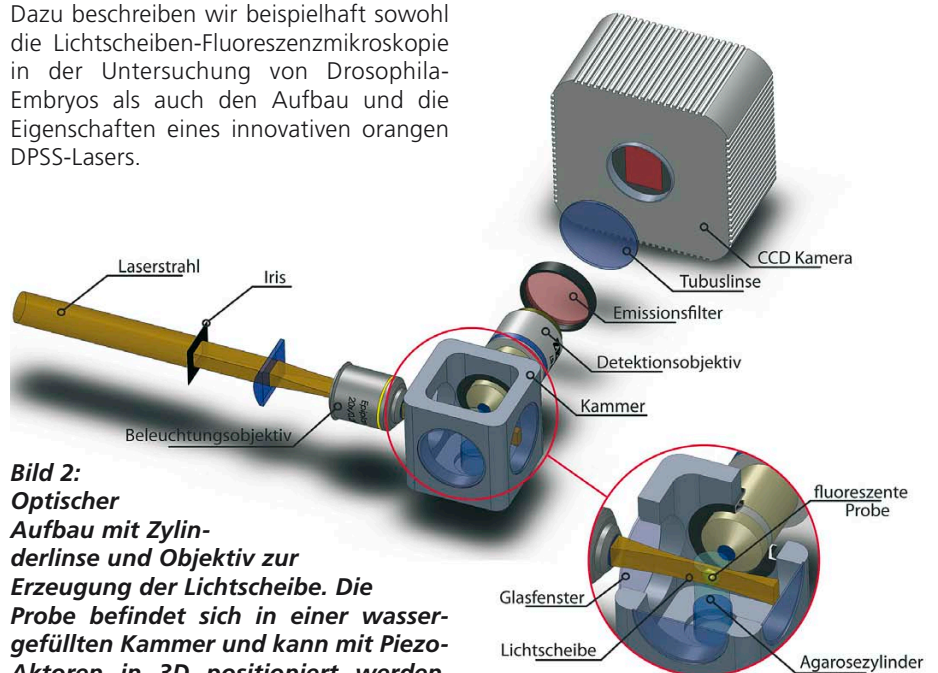


**Bild 1:** Funktionsweise eines Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskops. Fluorophore in einer wenige  $\mu\text{m}$  dünnen Ebene im Embryo werden von der Seite beleuchtet. Die emittierten Photonen werden vom Detektorobjektiv senkrecht zur Beleuchtungsebene eingesammelt. Die Fokalebene des Objektivs liegt in der Beleuchtungsebene

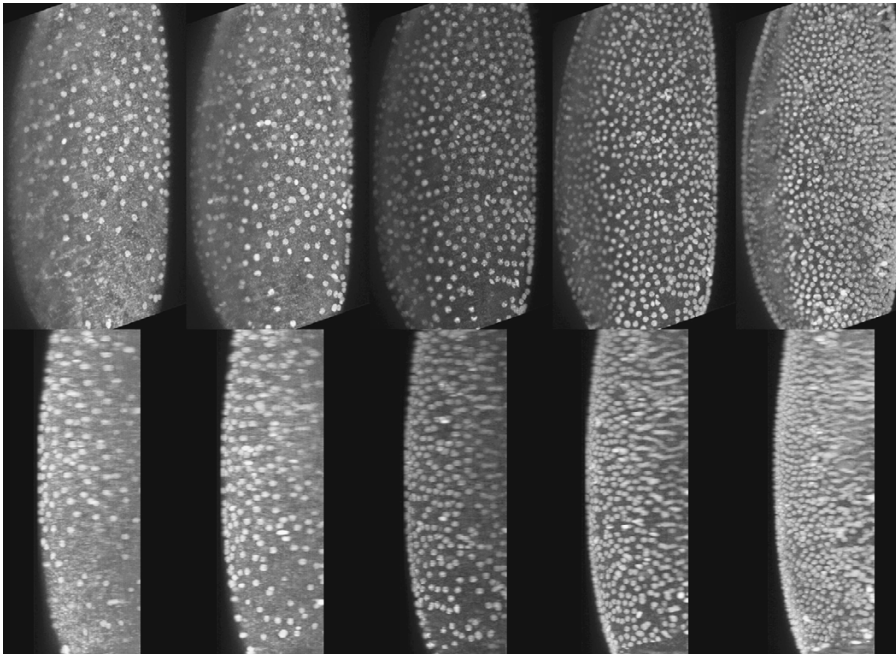
Als Quelle für diese Wellenlänge ist seit längerer Zeit der Helium-Neon- (HeNe-) Gas-Laser bekannt, der neben seiner 632,8-nm-Hauptlinie auch bei 594,1 nm emittieren kann. Allerdings ist dessen geringe Leistung von maximal 3 mW (polarisiert) für viele Anwendungen nicht ausreichend. Faserlaser mit Emission bei 592 nm bieten zwar Leistungen von mehreren 100 mW, haben aber ein deutlich höheres Rauschen, welches oft die Signal- und Bildaufnahmequalität verschlechtert. Wir zeigen im Folgenden auf, was in der Fluoreszenzmikroskopie durch stabile Festkörperlaser mit 594 nm in der Leistungsklasse 100 mW möglich wird. Dazu beschreiben wir beispielhaft sowohl die Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie in der Untersuchung von Drosophila-Embryos als auch den Aufbau und die Eigenschaften eines innovativen orangen DPSS-Lasers.

## 2 Technisches Konzept der SPIM

Die Sichtbarmachung und Quantifizierung biologischer Prozesse in lebenden Organismen bedarf Mikroskopiemethoden, die 3-dimensionale Fluoreszenz-Daten mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung liefern und gleichzeitig phototoxische Effekte minimieren. Die Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie (SPIM) hat sich in den letzten Jahren als alternatives Verfahren zur weit verbreiteten Konfokal- und Multiphotonenmikroskopie erwiesen, insbesondere auf entwicklungsbiologischen Skalen [3].



**Bild 2:** Optischer Aufbau mit Zylinderlinse und Objektiv zur Erzeugung der Lichtscheibe. Die Probe befindet sich in einer wassergefüllten Kammer und kann mit Piezo-Aktoren in 3D positioniert werden. Ein Eintauchobjektiv mit Tubulinse und Emissionsfilter erzeugt das Kamerabild



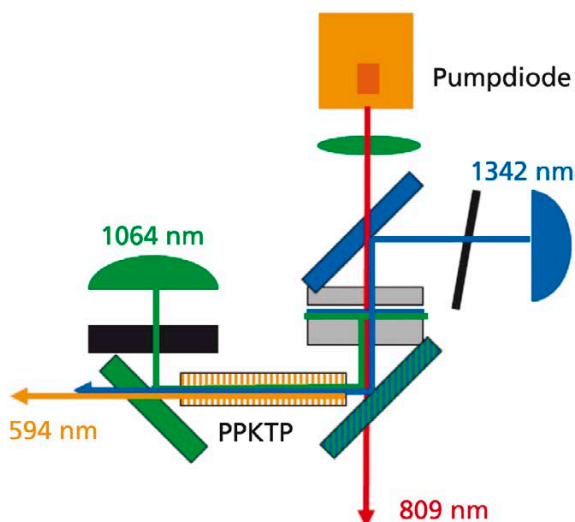
**Bild 3:** *Fruchtfliegen-Embryo im mitotischen Zellzyklus 10 bis 14 (v.l.n.r.). Von den Zellkernen eingeschlossene Histon-Proteine sind mit rot fluoreszierendem Protein (H2Av-mCherry) markiert. Die Anregungswellenlänge ist 594 nm, die Emission ist durch einen Bandpass 641/75 nm gefiltert. Die Dichte der Zellkerne nimmt mit jeder Kernteilung zu. Oben die Ansicht entlang der apikal-basalen Achse. Gezeigt ist die lokal Hintergrund-korrigierte maximale Intensitätsprojektion der 3D-Daten zu jedem Zeitpunkt. Die fluoreszierenden Proteine im Embryo werden dorsal angeregt (im Bild von rechts). Unten die dorsal-ventrale Ansicht zum jeweiligen Zeitpunkt. Die Auflösung ist um den Faktor 6 geringer als oben, und das Bild wurde entsprechend interpoliert (Aufnahmen mit EMCCD-Kamera Andor Ixon 885, Detektionsobjektiv 20x NA = 0,5, Lichtscheibendicke 4  $\mu$ m, Fliegenstämme Bloomington Nr. 23651)*

Wie die Ultramikroskopie [4-6] kombiniert die Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie konventionelle Weitfeld-Mikroskopie mit optischer Diskriminierung (optical sectioning) verschiedener Fokusebenen in der Probe durch eine Trennung der Beleuchtungs- und Detektionsachse. Die Grundzüge der Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie sind in **Bild 1 und 2** dargestellt. Anders als in konventionellen Mikroskopiemethoden erfolgt die Beleuchtung der Probe senkrecht zur optischen Detektionsachse. Dadurch werden nur die Fluorophore in der direkten Umgebung der Fokalebene des Detektionsobjektives angeregt. Im Vergleich zur Konfokalmikroskopie kann dadurch das Bleichen der Fluorophore außerhalb der Fokusebene reduziert und gleichzeitig ein kontrastreiches Bild gewonnen werden. Die emittierten Photonen werden vom Detektionsobjektiv eingesammelt und mittels der Tubuslinse auf eine Kamera abgebildet. Die hohe Quanteneffizienz moderner CCD- oder CMOS Kameras ermöglicht hohe Bildraten mit geringem Rauschanteil und hoher Bit-Tiefe.

### 3 Anwendungsbeispiel Fruchtfliege

Der Modellorganismus *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) eignet sich biologisch besonders zur Erforschung der Embryogenese. In einem Ei mit fester Form entwickeln sich die Zellkerne in synchronisierten Mitosezyklen, wobei sich alle Kerne zum gleichen Zeitpunkt teilen. Die Vitellinmembran und der Eidotter sind die Hauptquellen der Autofluoreszenz im Embryo der Fruchtfliege [7]. Insbesondere bei Anregungswellenlängen im blauen Spektralbereich (<520 nm) führt das breite Emissionsspektrum der Autofluoreszenz (bis zu 570 nm) zu erheblichen Beeinträchtigungen bei der Verwendung von blau und gelb fluoreszierenden Proteinen (z.B. ECFP, EGFP und EYFP). Der Beitrag der Autofluoreszenz im roten Spektralbereich ist hingegen nur sehr gering.

Durch die Wahl langwelliger Fluorophore (z.B. mCherry, mRFP – red fluorescent protein [1,2]) in Kombination mit einer passenden Anregungs-Laserwellenlänge können die Lichtstreuung und der Beitrag der Autofluoreszenz reduziert werden. **Bild 3** zeigt die zeitliche Abfolge der Zell-



**Bild 4: Funktionsprinzip eines DPSS-Lasers mit Summenfrequenz-Erzeugung auf 594 nm im PPKTP-Kristall**

kernteilung im frühen Embryonalstadium der Fruchtfliege.

## 4 Laserquelle in orange

Diodengepumpte Festkörperlaser (DPSS-Laser) nutzen das Pumplicht einer meist nah-infraroten Halbleiterlaserdiode und wandeln dieses Licht mittels Frequenzverdopplung innerhalb eines Laserkristalls um (SHG – second harmonic generation). Besonders gut sind z.B. Neodym-dotierte Yttrium-Aluminium-Granatkristalle (Nd:YAG) für diesen Prozess geeignet. Allerdings bietet dieses Materialsystem keine Möglichkeit, mittels SHG eine orange Laserlinie zwischen 580 und 600 nm zu erzeugen.

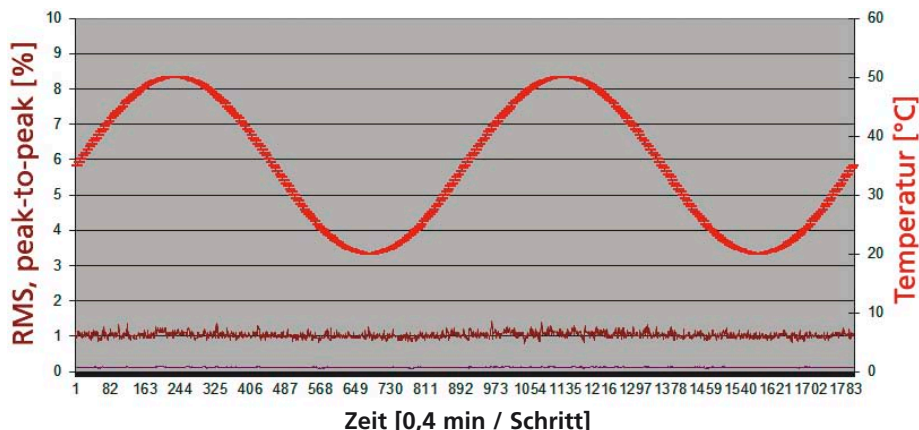
Hier greift ein anderes Verfahren, die Summenfrequenzgenerierung (SFG). Bei diesem parametrischen Prozess werden zunächst mit einer Laserdiode zwei

verschiedene Laserkristalle gepumpt, die jeweils eine Infrarotlinie emittieren. In einem speziellen Konversionskristall aus periodisch gepoltem Kalium-Titanyl-Phosphat (PPKTP), der ebenfalls in den Laserresonator integriert ist, wird dann die Summenfrequenz der IR-Linien erzeugt und verstärkt (**Bild 4**). Bei geeigneter Wahl der beiden fundamentalen IR-Wellenlängen erhält man orange Laseremission mit genau 594 nm.

Die Konversionseffizienz ist hier sehr hoch wegen der großen Nichtlinearität des PPKTP-Kristalls und der extremen Strahlintensität innerhalb des Resonators. Solche Laser erreichen bauartbedingt eine rauscharme Emission ( $<0,3\%$  rms) und eine hohe TEM<sub>00</sub>-Strahlqualität ( $M^2 < 1,1$ ). Ihr stabiler Langzeitbetrieb ohne Leistungsschwankungen (**Bild 5**) ist Voraussetzung für die tage- oder wochenlange Beobachtung der Entwicklung von Zellen in lebenden Organismen.

## 5 Fazit

Ein Verfahren wie die Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie besitzt wesentliche Stärken in der Beobachtung biologischer Prozesse lebender Organismen. In der Praxis ist die Methode aber nur so gut wie der zur Fluoreszenzanregung eingesetzte Laser. Von der Entwicklung geeigneter, hinreichend starker DPSS-Laserquellen mit Emission bei 594 nm profitieren inzwischen nicht nur Mikroskopieverfahren wie die Lebendzell-Bildgebung, sondern auch andere analytische Techniken wie die Durchflusszytometrie.



**Bild 5: Typisches Langzeit-Leistungsrauschen eines 594nm-DPSS-Lasers als Funktion der Temperatur bei zyklischer thermischer Belastung von 20-50°C über 12 Stunden**

## Literaturhinweise:

- [1] R.E. Campbell, O. Tour, A.E. Palmer, P.A. Steinbach, G.S. Baird, D.A. Zacharias, R.Y. Tsien, *A monomeric red fluorescent protein*, PNAS 99: 7877-82 (2002)
- [2] D. Shcherbo, E.M. Merzlyak, T.V. Chepurnykh, A.F. Fradkov, G.V. Ermakova, E.A. Solovieva, K.A. Lukyanov, E.A. Bogdanova, A.G. Zaraisky, S. Lukyanov, D.M. Chudakov, *Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging*, Nature Methods 4: 741 - 746 (2007)
- [3] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, E.H. Stelzer, *Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy*, Science 305: 1007-1009 (2004)
- [4] H. Siedentopf, R. Zsigmondy, *Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser*, Annalen der Physik 10: 1-39 (1903)
- [5] H.U. Dodt, U. Leischner, A. Schierloh, N. Jahrling, C.P. Mauch, et al., *Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain*, Nat Methods 4: 331-336 (2007)
- [6] A.H. Voie, D.H. Burns, F.A. Spelman, *Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens*, J Microsc 170: 229-236 (1993)
- [7] M. Mavrikis, R. Rikhy, M. Lilly, J. Lippincott-Schwartz, *Fluorescence Imaging Techniques for Studying Drosophila Embryo Development*, Current Protocols in Cell Biology, John Wiley & Sons (2008)
- [8] E. Ily, H. Karlsson, J. Hellström, *Low noise orange DPSS lasers for red fluorophore excitation*, CYTO: XXV ISAC Conf. 2010

## Ansprechpartner:

Dr. Lars Hufnagel  
Gruppenleiter, Zellbiologie und Biophysik  
European Molecular Biology Laboratory - EMBL  
Meyerhofstr. 1  
D-69117 Heidelberg  
Tel. 06221/387-648  
Fax 06221/387-512  
eMail: [hufnagel@embl.de](mailto:hufnagel@embl.de)  
Internet: [www.embl.de](http://www.embl.de)



Dag von Gegerfelt  
Geschäftsführer  
von Gegerfelt Photonics  
Hermann-Löns-Str. 4  
D-64625 Bensheim  
Tel. 06251/ 8609920  
Fax 06251/ 8609917  
[dag@vgphotonics.eu](mailto:dag@vgphotonics.eu)  
[www.vgphotonics.eu](http://www.vgphotonics.eu)



Elizabeth Ily, PhD  
Director of Sales & Marketing  
Cobolt AB  
Vretenvägen 13  
17154 Solna, Schweden  
Tel. +46/8/545912-30  
Fax +46/8/545912-31  
[elizabeth.ily@cobolt.se](mailto:elizabeth.ily@cobolt.se)  
[www.cobolt.se](http://www.cobolt.se)



**LASER 2011: Stand B1.320**

[www.bio-photonik.de](http://www.bio-photonik.de) ▶ Webcode **B1006**