

Neue high-tech-UV-Laserquellen helfen bei der Überwachung des klinischen Fortschritts und unterstützen die Forschung einschließlich der Immunologie

Multiparameter Messverfahren werden durch neue UV-Lasergeräte (349 nm und 360 nm) immer smarter - integrierte Lichtquellenmodule vereinfachen und beschleunigen die Entwicklung neuer Geräte.

Multi-Parameter-Durchfluss-Zytometrie

In einem Durchfluss-Zytometer strömt eine Anzahl von Zellen in zeitlicher Sequenz durch eine Messzone. Dabei passiert jede Zelle einen oder mehrere fokussierte Laserstrahlen, die durch Fluoreszenz und Streuung Signale erzeugen. Diese Signale werden in einer Serie von diskreten Wellenlängen-Kanälen durch Photomultiplier (PMTs) oder Avalanche-Photodioden (APDs)

in Verbindung mit Wellenlängen-selektiver Optik wie dichroitische Strahlteiler und Bandpass- oder Kantenfilter analysiert.

In vielen Anwendungsbereichen in Klinik und Forschung werden die Zellen mit einem oder mehreren fluoreszenten Reagenzien (Fluorochrome) präpariert. Bei geeigneter Präparation kann eine große Anzahl von unterschiedlichen Zellen schnell auf Oberflächen- oder innere Eigenschaften untersucht werden.



Abb. Immunologie wird immer wichtiger – Laserhersteller kommen mit innovativen Lösungen

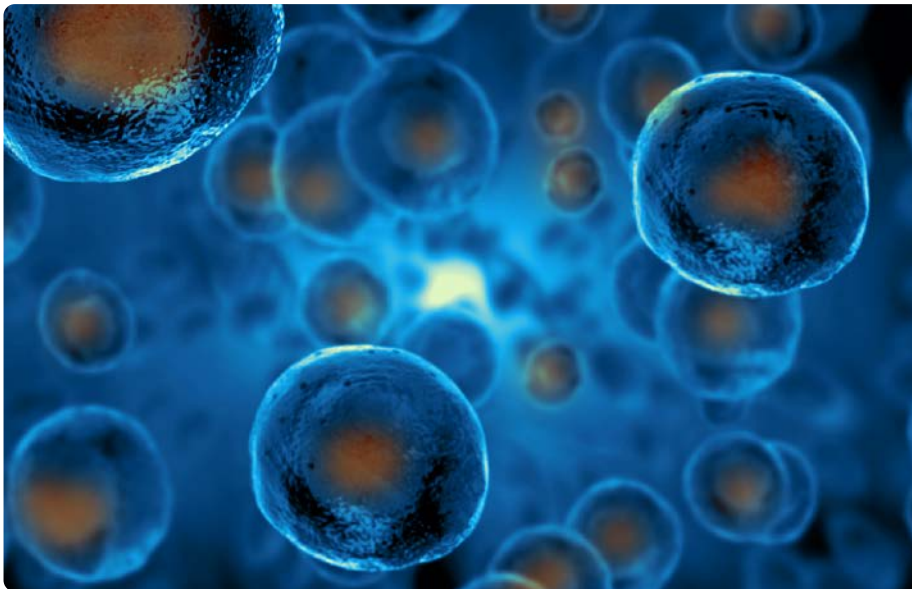


Abb: Die Zellforschung ist ein komplexer Vorgang, der mit Hilfe von Lasereinsatz vorangetrieben wird.

Eine besondere Stärke der Zytometrie ist die Multi-Parameter-Analyse. Hierbei korreliert ein Parameter mit einem spezifischen Fluorochrom, der Eigenfluoreszenz oder der Streuung unter einem spezifischen Winkel. Selbst mit nur einer Laserwellenlänge, (z.B. 488 nm) können mehrere Parameter analysiert werden. Dies ist möglich, da unterschiedliche Fluorochrome Strahlung bei 488 nm absorbieren, ihre Emissionsspektren jedoch verschieden sein können. Dabei registrieren die einzelnen Kanäle unterschiedliche Intensitäten.

Wenn mehrere Laser-Wellenlängen gleichzeitig mit spezifischen Fluorochromen verwendet werden, wächst die Anzahl der zu analysierenden Parameter. Dadurch kann ein Multicolor-Zytometer mit 5 Laser-Wellenlängen und mehreren Wellenlängen-spezifischen Detektoren

25 oder mehr verschiedene Parameter gleichzeitig analysieren.

Nach Optimierung einer Proben-Präparation gelingt mittels quantitativer Analyse von 20 unterschiedlichen Parametern die Identifikation vieler verschiedener Zelltypen mit hoher Spezifität.

Moderne Multi-Parameter-Durchfluss-Zytometer werden z.B. in der Immunologie, der Arzneimittelforschung und als wichtiges klinisches Diagnoseinstrument eingesetzt. Die Zahl der Anwendungen wächst kontinuierlich, neue Laser und komplexere Fluorochrome werden entwickelt. Aus der Sicht eines Laserherstellers sind die Steigerung der zu messenden Parameter und die einfache Integration mehrerer Laserwellenlängen zur schnelleren Geräteentwicklung und Kostenreduktion wichtig.

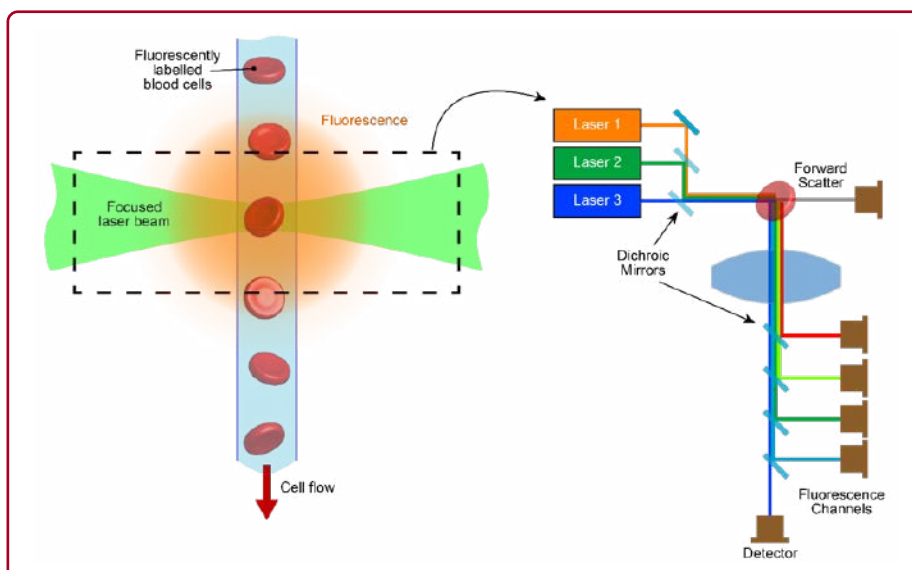


Abb. Durch die Verwendung von Lasern verschiedener Wellenlänge und mehreren Fluoreszenzkanälen kann ein einzelnes Instrument gleichzeitig mehrere Parameter analysieren

Die Erweiterung des UV-Wellenlängenbereichs – High-Tech Laserquellen – Herzstück für die Forschung

Im Bereich der Wissenschaft wird durch eine hohe Zahl möglicher Parameter die Durchführung komplexer Experimente ermöglicht. In der klinischen Anwendung können viele der detaillierten Messdaten, z.B. zur Verbesserung der individualisierten Behandlung in der Onkologie, beitragen.

Einige der heutigen Instrumente nutzen bereits 10 Laserwellenlängen im sichtbaren Spektralbereich. Die Multicolor-Zytometrie hat eine Vielzahl von Selektionsverfahren und neuen Untersuchungsmethoden ermöglicht. Laserwellenlängen im Spektralbereich vom IR bis zum UV lassen sich durch verschiedene Lasertechnologien und Methoden der Frequenzmischung und -Verdopplung erzeugen. In der Vergangenheit mussten verschiedene Lasertypen dazu kombiniert werden, um die erforderlichen Wellenlängen zu erzielen. Oft hatten die Laser unterschiedliche optische Eigenschaften oder hatten hohen Servicebedarf. Ein großer Fortschritt war die Möglichkeit, eine Vielzahl von Wellenlängen durch Festkörper- oder Halbleiterlaser zu erzeugen. Dies ermöglichte lange Lebensdauern und zuverlässigen Betrieb. Neue Wellenlängenbereiche im UV ermöglichen erweiterte Detektions- und Selektionsmethoden in der Zellforschung. Hier lassen sich oft auch Zellen ohne Zusatz optischer Marker detektieren.

Ein innovatives Konzept war die Zusammenführung verschiedener Lasertechnologien in einer Plattform mit identischer Form und Anschlüssen, die eine „drop-in“-Funktionalität mit einer großen Anzahl von Laserwellenlängen ermöglicht. Coherent hat diese Entwicklung mit der OBIS®-Produktlinie ins Leben gerufen, welche die beste Technologie zur jeder speziellen Wellenlänge bereitstellt.

Neben dem sichtbaren Spektrum ist der IR- und UV-Spektralbereich von großem Interesse. Zunehmend stehen kleine Laser mit geringer Abwärme, hoher Strahlstabilität und langer Lebensdauer zur Verfügung.

Die Situation hat sich mit der Entwicklung zweier neuer UV-Wellenlängen für die OBIS®-Laserbaureihe grundlegend geändert.



Abb: Coherent entwickelt stets neue miniaturisierte Laserquellen für die Zytometrie

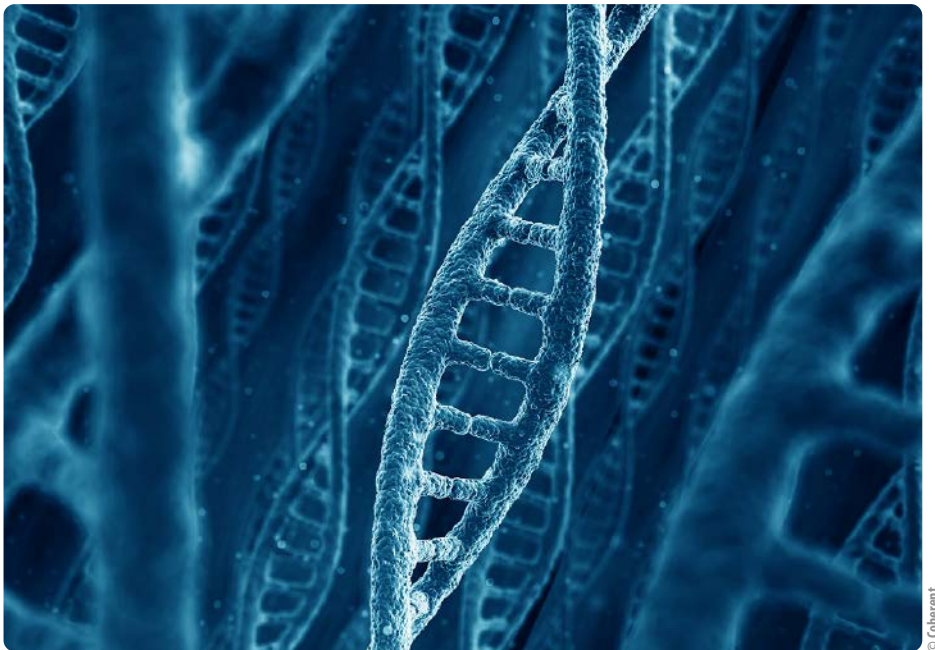


Abb. DNA Analyse und Durchfluss-Zytometrie werden häufig gemeinsam in der Zellforschung eingesetzt

Diese neuen OBIS® XT Laser haben Wellenlängen von 349 nm und 360 nm mit Ausgangsleistungen von 20, 60, oder 100 mW. Zwei neue UV-Laserwellenlängen mit ca. 10nm Wellenlängenabstand erlauben die Optimierung des Analyseinstruments hinsichtlich Signalgewinnung und Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffes. Es handelt sich hierbei um Dioden-gepumpte Festkörperlaser (DPSS-Laser) mit einer Resonator internen Frequenzverdopplung. In diesem Konzept ist keine Frequenzverdreifung mehr erforderlich, was die Effizienz der Laser erhöht und die Abwärme verringert. Dadurch können diese Laser mit gleicher Zuverlässigkeit, Lebensdauer und Abmessungen wie die übrigen Laser der OBIS-Familie gefertigt werden, was eine einfache Integration von einzelnen Lasern oder den Aufbau von kompakten Multi-Laser OEM-Modulen ermöglicht. Die neuen Laser der OBIS-Familie verfügen über das gleiche elektronische Interface und die gleiche Strahlcharakteristik wie die anderen OBIS-Laser: 0,7 mm Strahldurchmesser und TEM00, eine identische Spezifikation für Strahlstabilität, -symmetrie und andere Parameter.

Diese kompakten UV-Laser versprechen auch Fortschritte in anderen Anwendungen, wie der konfokalen Mikroskopie und der Halbleiterinspektion.

Integrierte Lichtquellen vereinfachen die Entwicklung neuer Instrumente

Unübersehbar ist die wachsende Nachfrage nach Lichtquellen mit mehreren Wellenlängen für kompakte Instrumente.

Ein Beispiel ist der einzigartige OBIS CellX von Coherent.

Dieser innovative OBIS CellX enthält mehrere mini-OBIS Laser (Obis Core) mit frei wählbaren Wellenlängen. Hierbei sind alle Laser, die Elektronik, die Strahlformungs- und Fokussierungsoptik in einem Modul eingebaut, was die Entwicklung von Multi-Parameter Instrumenten sehr vereinfacht. Diese serienmäßigen Module werden derzeit mit den 4 meistgenutzten Wellenlängen für Multi-Parameter Instrumente ausgerüstet: 405, 488, 561 und 637 nm.



Abb. Miniaturisierte OBIS Laser sind im OBIS CellX eingebaut.



Abb. In dem Multiwellenlängen-Laser OBIS CellX sind mehrere mini-OBIS Laser integriert. Dieser hat sich bereits auf dem Markt erfolgreich durchgesetzt und ist führend in der Durchflusszytometrie.

Das senkt die Komplexität und die Gesamtkosten beim Einbau von Lasern in Multiwellenlängen-Geräten für die Life-Sciences-Anwendung, wie bei Durchfluss-Zytometern. Der OBIS CellX ist eine kompakte Quelle, in der die Laser, die elektronische Steuerung und die Strahlführungsoptik in einer einzigen Einheit integriert sind. Der CellX verfügt über eine Steuerungsplatine für alle Laser, gängige Netz- und RS232/USB-Anschlüsse sowie einen E/A-Anschluss. Außerdem kann der Kunde die Justierung und den Fokus für jede Wellenlänge getrennt einstellen, sodass die TEM00-Ausgaben für jeden einzelnen Laser speziell ausgerichtet und positioniert werden können, was die Flexibilität und Bedienbarkeit noch weiter verbessert.

CellX basiert auf der bewährten Plug&Play-fähigen OBIS-Plattform von Coherent. Er ist in zwei Standardformaten verfügbar: eine Version mit drei Kanälen und Ausgaben bei 405, 488 und 640 nm sowie ein Modul mit vier Kanälen, das auch Laserlicht mit einer Wellenlänge von 561 nm ausgeben kann. Bei der Ausgangsleistung kann im CellX zwischen 50 mW oder 100 mW pro Wellenlänge gewählt werden, was sich sowohl für die Zellanalyse eignet als auch die höhere Leistung bereitstellt, die für die Zellsortierung erforderlich ist.

Alle Optiken – in Anbetracht der Marktanforderungen – sind bereits kompatibel mit den neuen UV-Wellenlängen (frühere Laseroptiken für den sichtbaren Bereich hatten keine oder geringe Durchlässigkeit im UV-Wellenlängenbereich) Zytometer nutzen diese Lichtquellen als eine Serie von Laserstrahlen mit elliptischem Fokus für hohe Zeitauflösung und große Toleranz der Zellposition beim Messvorgang.

Der OBIS CellX verfügt über variabel justierbare Ausgangsstrahlen. Eine genaue Einstellmöglichkeit für jeden der 4 Strahlen ermöglicht die Separation zwischen den versetzten Fokuslagen in einem Bereich von 0 (übereinanderliegend) bis $\pm 250 \mu\text{m}$. Die Dimensionen der Ellipse in x- und y-Achse können für jede Wellenlänge justiert und Form, Lage und Position aller vier Laserstrahlen eingestellt werden. Die Strahlparameter sind speziell für Durchfluss-Zytometer optimiert. Mithilfe der sicheren Lasereinstellungen des CellX können Kunden auch flexible Streifenmuster generieren, die auf ihre Durchflusszelle angepasst sind. Über eine USB-Verbindung kann jeder Laser separat angesteuert werden.

OBIS CellX bietet gleichzeitig mehrere Vorteile. Der Instrumentenhersteller kann durch Outsourcing von Laserintegration und Strahlführung Entwicklungskosten sparen, verkürzt die Zeit zur Marktein-

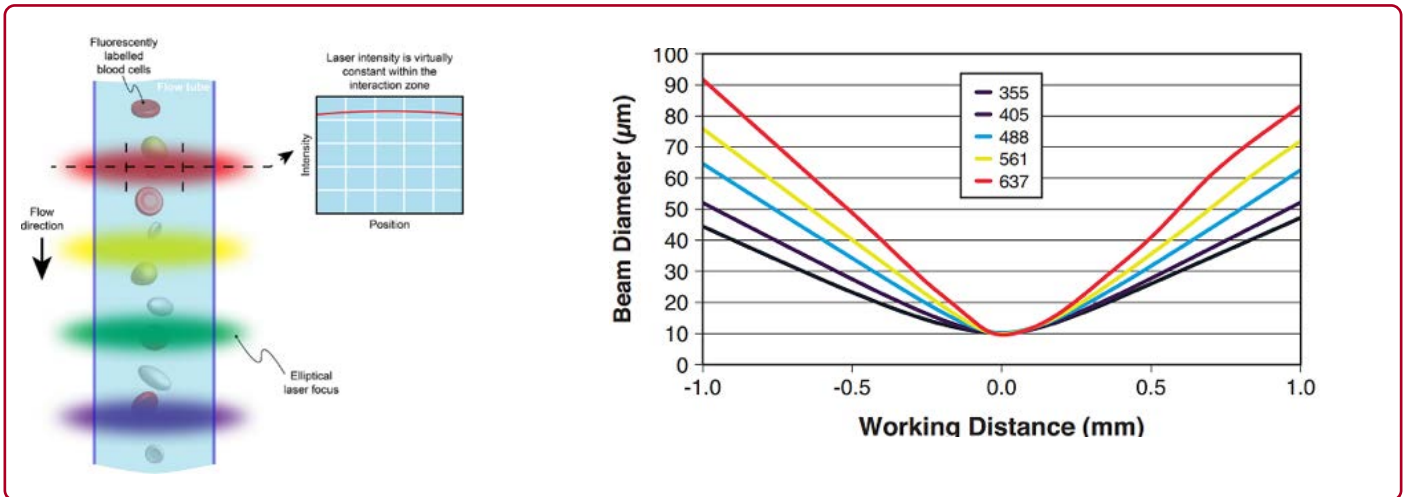


Abb: Integrierte Lichtquellen mit Lasern und Optiken für vier fokussierte Strahlengänge mit unabhängig frei wählbarer Strahldistanz, Form und variablem Fokusbstand, die durch den Instrumentenhersteller angepasst werden können. In Zytometern erzeugen diese Lichtquellen eine Serie von Laserstrahlen mit elliptischem Fokus (siehe linkes Bild), wobei die kurze Achse die Zeitauflösung des Instruments bestimmt und die Ausdehnung der langen (lateralen) Achse den Einfluss der Zellposition beim Messvorgang minimiert.

führung und verfügt über erprobte Komponenten mit hoher Funktionssicherheit. Standardisierte Komponenten und Elektronik sparen Kosten – beispielsweise bei Verwendung nur eines Laser-Kontrollboards und gemeinsamer Stromversorgung. Outsourcing der Photonik-Technologie erlaubt dem Gerätehersteller mehr Zeit zur Optimierung der Chemie der Fluorochrome und anderer Geräteeigenschaften sowie neuer Analysemethoden und Messtechniken.

Der OBIS CellX ist für Gerätehersteller gedacht, die mehrere Laser inklusive der zugehörigen Infrastruktur und Strahlzuführung integrieren möchten. Als integrierte Standardlösung stellt der CellX eine außerordentlich kostengünstige Lösung

dar, die den Zeit- und Kostenaufwand für die Entwicklung reduziert. Bei Aufträgen von mehreren Einheiten sind auch kundenspezifische Strahlkonfigurationen und alternative Wellenlängenkombinationen möglich.

Zusammenfassung

Die Durchfluss-Zytometrie ist ein Feld mit dynamischer Entwicklung und die Anforderungen seitens Forschung und klinischer Anwendung wachsen stetig. Ein wesentlicher Aspekt ist der Laser als Messwerkzeug. Neue Lasertechnologien, Standardisierung und Miniaturisierung der Laserquellen leisten einen bedeutenden Beitrag zur Entwicklung der Zytometrie.

Laserhersteller unterstützen diese Entwicklung mit neuen Lösungen für die nächste Gerätegeneration in der individualisierten Medizin und Behandlungsmethoden der Zelltherapie.

Autor:



Dr. Matthias Schulze,
Coherent,
matthias.schulze@coherent.com
Tel: 030-30100786
mobil: +49-172-6831603



Abb. Neue Laserlösungen bringen die Medizin voran.

Presse / Marketing Communications Europa:



Petra Wallenta,
Coherent,
petra.wallenta@coherent.com
www.coherent.de
www.coherent.com