# ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВЫХ 515-нм DPSS-ЛАЗЕРОВ

*Л. Кестнер, П. Липп,*
*Университет Саарланд,*
*Гамбург/Саар, Германия;*
*Д. Гегерфельт, Бенсхайм, Германия;*
*Х.Карлсон, Е.Илли, Дж.Хельстрём, Cobolt AB,*
*Стокгольм, Швеция*

**Новые твердотельные лазеры с диодной накачкой (Diode-Pumped Solid-State – DPSS), излучающие на длине волны 515 нм, заполняют серьезный пробел в линейке компактных полностью твердотельных лазеров (ПТЛ). Новая технология прежде всего будет востребована в биологии, например, при исследовании живых клеток, в использовании конфокальной, FRET (флюоресцентный резонансный перенос энергии)-, FRAP (восстановление флюоресценции после фотовыжигания)- и TIRF (полная внутренняя микроскопия флюоресценции)-микроскопии, а также проточной цитометрии.**

В последние годы в качестве источников возбуждения в биоаналитической измерительной технике вместо газовых лазеров все чаще используются ПТЛ. По сравнению с газовыми лазерами DPSS-лазеры компактны, характеризуются низким тепловыделением, потребляют меньше мощности, при их работе отсутствуют вибрации или шум, они обладают высокой стабильностью лазерного излучения, а также бóльшим временем жизни. На данный момент доступны лазерные диоды, излучающие в УФ-, темно-синей (375, 405, 445, 488 нм), а также в красной и ИК (635, 780, 830 нм)-областях спектра.

Однако пока не существует лазерных диодов, излучающих в желто-зеленом диапазоне видимой области спектра, но соответствующие разработки уже начатлись (например, [1,2]). Поэтому на данный момент для получения лазерного излучения в этом диапазоне используются DPSS-лазеры, работающие на типовых длинах волн – 488, 532

# FLUORESCENCE MICROSCOPY OF LIVING CELLS USING NEW 515-nm DPSS-LASERS*

*L. Kaestner, P. Lipp, Saarland University,*
*Homburg/Saar, Germany;*
*D-von- Gegerfelt,*
*Bensheim, Germany;*
*H.Karlsson, E.Illy, J.Hellström, Cobolt AB,*
*Stockholm, Sweden*

**A novel diode-pumped solid-state (DPSS) laser emitting at 515 nm is closing an important gap in the area of compact all solid-state lasers. Especially biological applications such as live cell imaging using confocal microscopy, FRET, FRAP and TIRF microscopy as well as flow cytometry are benefiting from this new technology. The use of solid-state lasers as excitation sources in bioanalytical instrumentation technology, as alternatives to gas lasers, has grown increasingly popular over the last few years. They bring a multitude of advantages in comparison to gas lasers, such as compact size, less heat generation and power consumption, no vibration or noise, high beam stability and longer lifetime. Diode lasers are available in the UV and deep-blue (e.g. 375, 405, 445, 488 nm) as well as in the in red/IR (e.g. 635, 780 and 830 nm).**

In the green-yellow spectral range of visible light there are currently no laser diodes available as yet, although suitable semiconductors with an adequate band gap are in an early stage of development (e.g. [1, 2]). Therefore, this spectral range is currently covered by DPSS lasers, with typical laser lines of 488, 532 and 561 nm. Until now there was one important gap, however, around 515 nm; a wavelength around which many fluorochromes (fluorescent markers or "tags" attaching to the microscopic objects to be studied) can be excited (figure 1). Due to the lack of alternatives, and despite all the disadvantages that an ion laser system brings with it, argon and argon-krypton lasers have been used to fill this gap.

We describe below the technical background and applications for an innovative DPSS laser, which with its 515 nm emission now can replace the argon laser.

* Перевод – М. Пыльнев, АЗИМУТ-ФОТОНИКС.

и 561 нм. Однако до настоящего времени не существовало лазера, излучающего на длине волны ~515 нм; на этой волне могут быть возбуждены многие флюорофоры (фрагменты молекул, придающие им флюоресцентные свойства, рис.1). Из-за отсутствия альтернатив ранее использовались аргоновый и аргоно-криптоновый лазеры, несмотря на все присущие им недостатки ионных лазеров. Далее рассмотрим техническое описание и применения инновационного DPSS-лазера, который, работая на длине волны 515 нм, способен заменить аргоновый лазер.

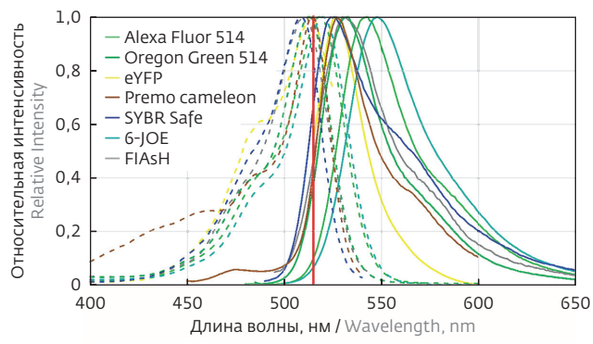



***Рис.1.*** *Спектры возбуждения (пунктирные линии) и флюоресценции (сплошные линии) распространенных лазерных генераторов излучения на красителях, которые могут быть возбуждены лазерным излучением с длиной волны λ = 515 нм*

***Fig. 1.*** *Excitation (dotted) and fluorescence spectra (solid lines) of popular fluorescent dyes that can be efficiently excited with a 515 nm laser*

## ТЕХНИЧЕСКИЙ КОНЦЕПТ

Типичные широкоапертурные лазерные диоды с торцевым излучением применяют в качестве источников накачки в новых DPSS-лазерах. Активная среда в таком лазере представляет собой легированный иттербием (Yb) лазерный кристалл, излучающий на длине волны 1030 нм. Частота удваивается с помощью эффективного внутрирезонаторного частотного преобразования [3] в кристалле калий-титанил-фосфата с регулярной доменной структурой (рис.2). Спектральные фильтры позволяют лазеру работать в режиме одной продольной моды (ширина полосы частот менее 1 МГц), что обеспечивает очень низкий уровень шума и стабильность выходной мощности в широком температурном диапазоне (рис.3). Использование вогнутого зеркала позволяет получить лазерное пятно с высоким качеством поперечной структуры при всех выходных мощностях. Лазерный резонатор заключен в маленький герметично закрытый блок, который обеспечивает высокую стойкость к вибрациям, ударам, изменениям температуры и влажности окружающей среды. Такая концепция лазера позволяет конструировать лазеры с различной выходной мощностью. Помимо изначально разработанного 25-мВт лазера на данный момент стали доступны 50-мВт лазеры для более мощных приложений, таких как FRAP (восстановление флюоресценции после обесцвечивания), высокоскоростная сортировка клеток, плашечный анализ и конфокальная микроскопия на основе вращающегося диска (диска Нипкова).

## TECHNICAL CONCEPT

Standard broad-striped edge-emitting laser diodes are used as pump sources for the new DPSS laser. The gain medium is an Yb-doped laser crystal emitting at 1030 nm. The emission is coupled into a second crystal within the resonator (figure 2) made from periodically poled potassium titanyl phosphate (PPKTP) for efficient intracavity frequency conversion [3]. Spectral filters make the laser operate in a single longitudinal mode (<1 MHz bandwidth), which results in very low noise and stable output power over a wide temperature range (figure 3).

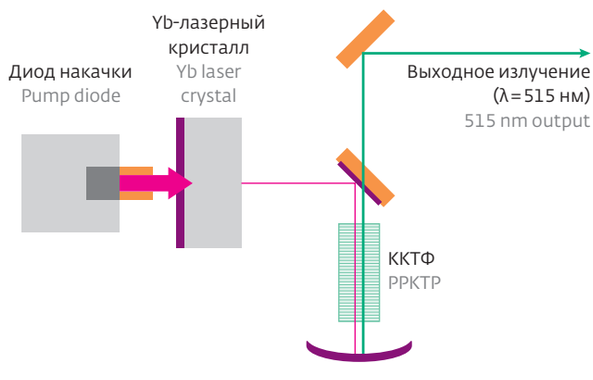



***Рис.2.*** *Принципиальная схема DPSS-лазера Cobolt Fandango (λ = 515 нм) (ККТФ–кристалл калий-титанил-фосфата с регулярной доменной структурой)*

***Fig. 2.*** *Schematic setup of the 515 nm DPSS laser Cobolt Fandango*

## ПРИЛОЖЕНИЯ

В последнее время во всем новом и обновляемом биоаналитическом оборудовании лазерные диоды и DPSS-лазеры оказались более предпочтительны, чем газовые лазеры. Это коснулось

таких методов, как проточная цитометрия, ДНК-секвенирование; методов микроскопии – конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, микроскопии полной внутренней флюоресценции (TIRF) и флюоресцентной корреляционной спектроскопиия (FCS). Поглощающие пики многих флюоресцирующих красителей флюорофоров расположены близко к рабочей длине волны аргон-ионного лазера (рис.1). В их ряду – пики таких антител, как Alexa Fluor 514 и Oregon Green 514, пик желтого флюоресцентного белка eYFP, флюоресцентные белковые гибридные белки, как например Premo Cameleon, а также пики, связанные с ферстеровским переносом энергии (FRET) между голубым(CFP) и желтым(YFP) флюоресцентными белками. В этом же диапазоне расположены пики других важных веществ, в частности пики поглощения 6-JOE, используемого для автоматического ДНК-секвенирования. Рядом – пик, близкий к длине волны SYBR Safe-красителя (λ=515 нм). Это вещество способно заменить токсичный бромистый этидий (EtBr) в задачах визуализации ДНК. Следом за ними идет пик FlAsH – малоинвазивной тетрацистеиновой белковой бирки, белковый мостик которой содержит всего один пептид, состоящий из шести аминокислот.

Для наблюдения всех перечисленных веществ требуется лазер, работающий на длине волны ~514,5 нм. И производители соответствующего оборудования вынуждены снабжать свои аналитические устройства громоздкими аргон-ионными лазерами, часто вынесенными в отдельные блоки и соединенные с основной установкой посредством оптоволокон. Хотя, несомненно, все остальные возбуждающие лазерные линии могут быть получены с помощью компактных твердотельных лазеров, интегрированных в корпус измерительного оборудования. Новый 515-нм лазер Cobolt Fandango способен решить эту проблему. Ниже мы представим свежие экспериментальные результаты по наблюдению за живыми клетками, полученные в Институте молекулярной клеточной биологии Саарландского университета (Германия) при помощи конфокальной микроскопии с использованием этого лазера.

## ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК

В новейших биомедицинских исследованиях растет интерес к высокоразрешающей флюоресцентной микроскопии, используемой для изучения живых клеток. Этот метод применяют

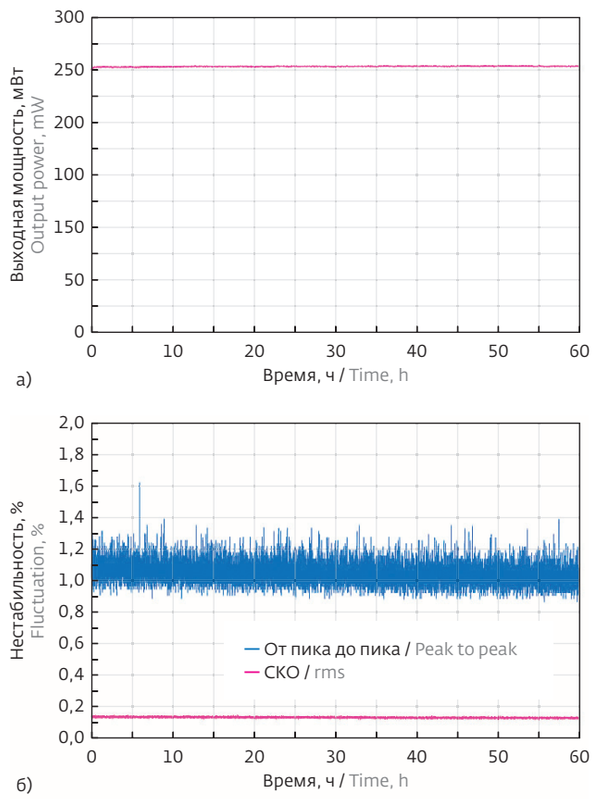



***Рис.3.*** *Характеристики излучения (время съемки > 60 мин): а) – стабильность выходной мощности; б) – уровень шума*

***Fig. 3.*** *Long-term output power stability and intensity noise (measured over 60 h)*

The use of a separate curved cavity mirror ensures a very high transversal mode quality ($TEM_{00}$) in the output beam at all output power levels. The laser cavity is enclosed in a small and robust hermetically sealed package, which provides a very high degree of resistance to varying ambient temperature and humidity conditions as well as to mechanical shocks and vibrations.

The laser concept is inherently power scalable. Initially introduced as a 25 mW laser, a 50 mW model is available in the meantime in order to support more power demanding applications such as FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), high-speed cell sorting, plate reading, and high-speed spinning disc confocal microscopy (cf. section 3).

## APPLICATIONS

In recent years, diode lasers and diode pumped solid-state lasers have become the first choice in nearly every new or updated bioanalytical instrument in

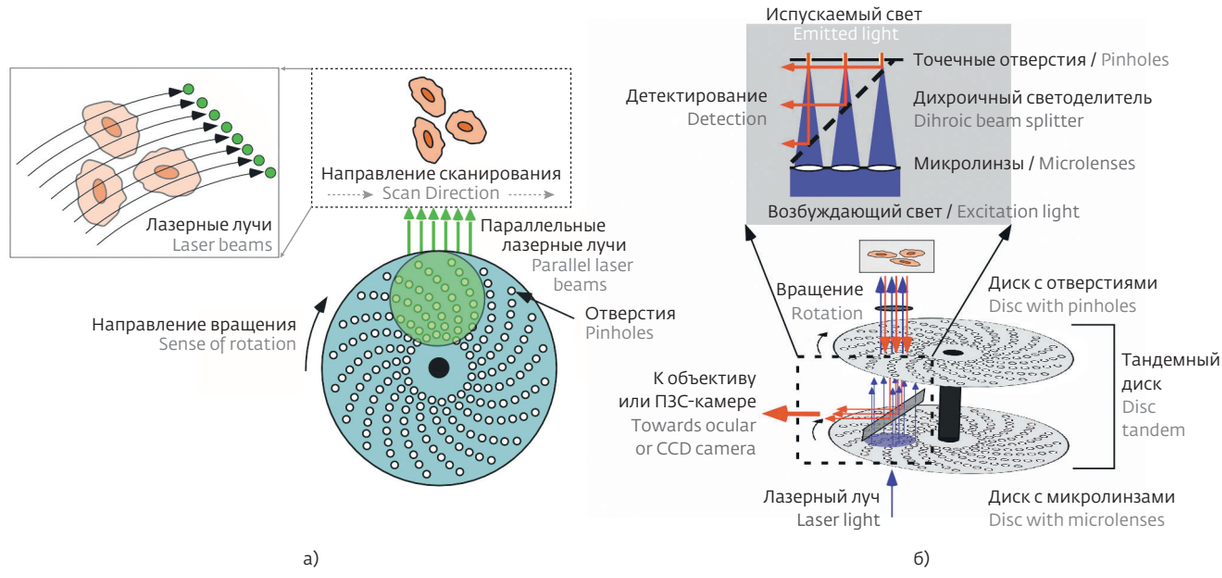



***Рис.4.*** *Принципы создания изображения: а)– принцип сканирования в популярном многолучевом микроскопе с использованием диска Нипкова; б) – схема с использованием тандемного диска, содержащего диск с микролинзами и диск с отверстиями (также показан путь света через диски)*

***Fig. 4.*** *A: Scanning principle of popular multibeam confocal microscopes with Nipkow disk. B: setup of a tandem disk that consists of aligned microlens-and pinhole-disks. The light path across the tandem disk is also indicated*

Одночастотные малошумящие DPSS лазеры **Cobolt**

**АЗИМУТ ФОТОНИКС**
оптоэлектронные компоненты

Особенности:
- длина волны излучения от 355 нм до 1064 нм;
- непрерывный режим работы с выходной мощностью от 10 мВт до 3000 мВт;
- одночастотность, спектральная ширина линии<1 МГц;
- высокое качество пучка, $TEM_{00}$ M2;
- низкий шум, среднее значение <0.1%;
- оптоволоконный выход и различные радиаторы для теплоотвода;
- в комплект поставки входит лазерная головка и контроллер с интерфейсом USB или RS-232;
- гарантия 2 года при неограниченном количестве часов работы

Применения:
- проточная цитометрия;
- флуоресцентная микроскопия;
- рамановская спектроскопия;
- голография;
- интерферометрия;
- оптогенетика

ЗАО «НТК «АЗИМУТ ФОТОНИКС»
Москва, ул. Хавская, д.11
Тел.: (495) 507-44-98, (495) 792-39-88
факс: (495) 958-23-09
e-mail: info@azimp.ru
www.azimp.ru

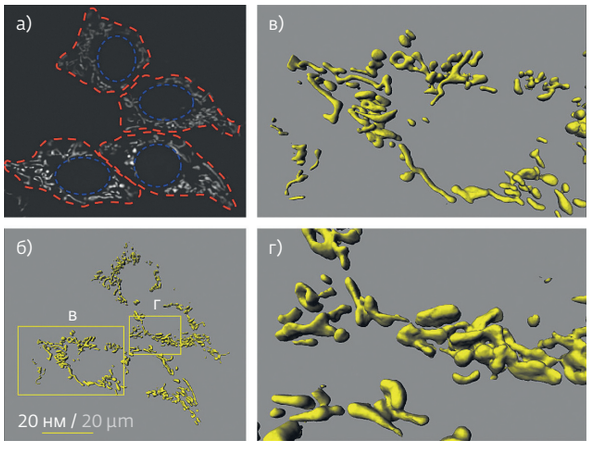



***Рис.5.*** *Трехмерная морфология органеллы живых клеток COS-1, полученная с использованием флюоресцентного белка eYFP, введенного в митохондрию: а) – конфокальное сечение группы из четырех клеток ( красные точечные линии изображают границы клеток; голубые точечные овалы показывают положения ядер клеток; флюоресценция митохондрий показана оттенками серого); б) – трехмерное компьютерное изображение, построенное на основании 30 плоских изображений сечений, фрагменты которых представлены на в) и г)*

***Fig. 5.*** *3D-organelle morphology of living COS-1 cells using the yellow fluorescent protein eYFP expressed in the mitochondria. A shows a confocal section through a group of four cells. The ret dotted lines mark the cell boundary, the blue dotted ovals represent the position of the cell nucleus. Fluorescence from the mitochondria is depicted in shades of grey. The 3-dimensional image in B was computed from 30 such sections, with details shown in C and D*

как для структурных и морфологических исследований, так и для изучения динамических процессов, вплоть до визуализации биохимических реакций. Некоторые из этих реакций, особенно те, что протекают в мозге и в сердечных мышцах, настолько быстротечны, что требуемая частота кадров достигает сотни изображений в секунду. Традиционные методы конфокальной микроскопии обычно не способны обеспечить такие скорости съемок. Поэтому для этих целей используют многоволновые методы (когда одновременно множество параллельных лазерных лучей попадают на цель), а также конфокальную микроскопию щелевой развертки. На данный момент для таких исследований наиболее популярными у приборостроителей являются устройства на основе тандемного сканера с использованием диска Нипкова (рис.4). Обычно в таких приборах

which gas lasers had previously been used. These affected applications include flow cytometry, DNA sequencing and microscopy techniques such as confocal laser scanning microscopy, total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy or fluorescence correlation spectroscopy (FCS).

Many fluorescent dyes and fluorophores have their absorption maxima around the 514.5 nm argon-ion laser line (figure 1). These include e.g. anti-body markers like Alexa Fluor 514 and Oregon Green 514, the yellow fluorescent protein eYFP, fluorescent protein-based fusion proteins such as the calcium indicator Premo Cameleon as well as one of the many constructs that are based upon Förster resonance energy transfer (FRET, also fluorescence resonance energy transfer) between the cyano fluorescence protein (CFP) and the yellow fluorescence protein (YFP). Further markers with absorption maximum close to 515 nm are e.g. SYBR Safe, a substance, which can replace the toxic ethidium bromide (EtBr) for DNA gel staining, 6-JOE, used in automated DNA sequencing, or FIAsH, a minimally invasive tetracystein-based protein tag, the protein linker of which consists of just one peptide made from six amino acids.

For such applications, requiring a laser excitation line around 514.5 nm, system suppliers have had to add a bulky argon-ion laser to their equipment, often in a separate external box and coupled through an optical fibre, even when all other laser lines could be reached using small solid-state lasers integrated into a desktop instrument. The 515 nm Cobolt Fandango is now a solution to this problem. From recent tests of its function at the Institute for Molecular Cell Biology at Saarland University, we describe here some of the applications in confocal live cell imaging.

## LIVE CELL IMAGING

In modern biomedical research, high-resolution fluorescence microscopy for the study of living cells plays an increasingly important role. This accounts for structural and morphological investigations as well as for dynamical processes all the way to the visualization of biochemical reactions. Several of these signal processes, especially in the brain and in heart muscles are so fast that a frame rate of several hundred images per second is necessary.

Conventional confocal microscopes are usually not able to reach such imaging speeds and thus multi-beam approaches, in which many parallel laser beams are used simultaneously, as well as slit-scanning confocal microscopes have become more and more common in the last few years. Currently, the most popular instruments are based on the

используется сканирующая головка, разработанная корпорацией Yokogawa. Другими примерами реализации многолучевых методов являются конфокальный микроскоп развертки поля (Nikon, Japan) и Kilobeam Array Scanner (VisiTech, UK). Так как в таких приборах лазерный пучок расщепляется на несколько лучей, выходная мощность лазера должна составлять не менее 20 мВт. Для испытания лазера Cobolt Fandango 515 нм инструмент был непосредственно установлен в многолучевой конфокальный микроскоп VT-infinity (VisiTech, UK), настроенный для наблюдения за живыми клетками. На рис.5 изображена митохондриальная система в культуре клеток почек африканской зеленой мартышки (COS-1). Флюоресценция исходит от желтого флюоресцентного белка eYFP, который был включен в митохондриальную последовательность из цитохром с-оксидаз, а поэтому позволяет изучать исключительно только митохондрию. Понятно (см. рис.5), что митохондрия, вопреки распространенным иллюстрациям в учебниках, не всегда яйцевидна, а может принимать сложные формы.

В качестве другого примера (рис.6) показано динамическое перемещение протеинкиназы Cα

so-called Tandem-Nipkow-Scanner, see figure 4, the scan head being manufactured by Yokogawa Inc. and implemented by a number of different companies. Other examples of multi-beam scanners are the “Swept-Field” confocal microscope (Nikon, Japan) and the “Kilobeam Array Scanner” (VisiTech, UK). As the output beam from the laser in these instruments is split into several beams, a laser output power level of at least 20 mW is required.

To test the Cobolt Fandango 515 nm laser in fluorescence microscopy, the laser was directly coupled into a VT-Infinity (VisiTech, UK) multi-beam confocal microscope set up for live cell imaging. Figure 5 shows images of the mitochondrial network in cells from a kidney cell line of the African green monkey (COS-1). The fluorescence comes from the yellow fluorescent protein eYFP, which was fused to the mitochondrial specific sequence from the subunit VII of the cytochrom C oxidase, and thus exclusively expressed in the mitochondria. From the 3D reconstruction details, it is obvious that the mitochondria – contrary to the typical textbook illustrations – are not always egg-shaped, but that they can have many different and highly complex, shapes.

In another example a dynamic translocation of the signal molecule protein kinase C!, again coupled


**Микроспектрометр C12666MA**

**HAMAMATSU PHOTONICS представляет новый сверхкомпактный микроспектрометр C12666MA произведенный с использованием новейшей технологии микрооптоэлектромеханических систем MOEMS, интегрирующей оптические компоненты с микроэлектромеханическими системами MEMS и позволяющей удешевить производство приборов и уменьшить их габаритные размеры.**

**Основные черты:**
- Спектральный диапазон: 340 - 780 нм
- Компактные размеры: 20,1 x 12,5 x 10,1 мм
- Герметичный металлический корпус
- Высокая надежность
- Вес: 5 г

**Применения:**
- Переносное компактное измерительное оборудование
- Системы контроля и управления цветом в принтерах
- Компактные персональные медицинские приборы (Point-Of-Care)
- Компонент для гаджетов к мобильным телефонам и планшетам

HAMAMATSU
PHOTON IS OUR BUSINESS
www.hamamatsu.com
Представительство Hamamatsu Photonics в России и СНГ
Тел: +7 (495) 258-85-18, E-mail: info@hamamatsu.ru

(исследованное с помощью соединения ее с eYFP) после введения аденозинтрифосфата (АТФ). Здесь также материнскими клетками, содержащими комплексный белок, служили COS-1 клетки. Интерпретация и актульность этого процесса выходит за рамки данной статьи (дополнительная информация может быть найдена, например, в [4,5]). Тем не менее, из приведенных примеров ясно, что динамические процессы в живых клетках теперь могут быть успешно исследованы с помощью аппаратуры с применением DPSS-лазеров, подходящих для исследований с помощью eYFP.

## ПЕРСПЕКТИВЫ

В качестве более перспективного применения DPSS-лазера (по сравнению с представленными примерами подкрашивания с помощью YFP), можно провести количественный анализ с использованием наиболее распространенного на сегодняшний день голубого флюоресцентного белка CFP. Это актуально для внутримолекулярной FRET-микроскопии с использованием индикатора Cameleon (например, Premo-Camilion, см. рис.1) или киназ, а также для межмолекулярной FRET-микроскопии для детектирования рецепторных связей и других молекулярных взаимодействий.

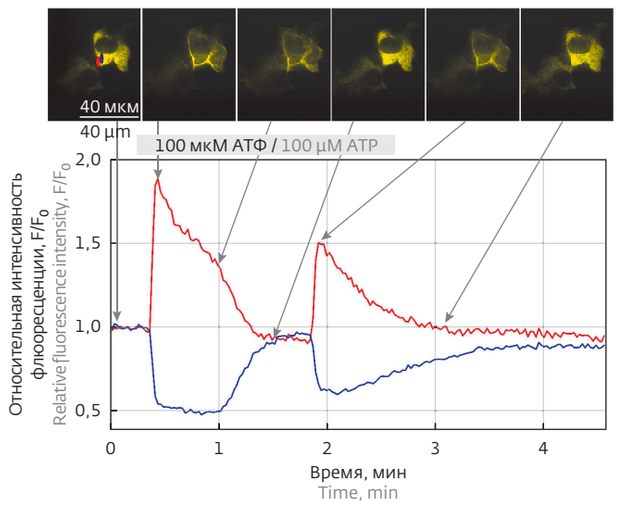



***Рис.6.*** *Динамика белка в живых клетках COS-1, трансфицированных с помощью гибридного белка из протеинкиназы Cα, соединенной с eYFP (кривые показывают временные зависимости интенсивности свечения в двух пиках, отмеченных красным и синим цветом на рис.1). При стимуляции с помощью 100 мкМ АТФ (серая кривая), можно наблюдать колебательное перемещение комплексного белка из цитозоля по направлению к клеточной мембране*

***Fig. 6.*** *Protein dynamics in living COS-1 cells, transfected with a fusion protein from the protein kinase C! coupled to eYFP. The curves indicate the temporal evolution of fluorescence intensity within the two regions, marked red and blue in the fig.1. During stimulation with 100 µM ATP (grey bar), an oscillating translocation of the fusion protein from the cytosol towards the plasma membrane can be seen*

## ЛИТЕРАТУРА


1. www.darpa.mil/MTO/Programs/vigil. DARPA (Defense Advanced Research Projects Agency, USA) project Visible InGaN Injection Lasers (VIGIL).
2. http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=4097109. Wallerand J.-P. A frequency doubled amplified fiber laser for molecular iodine spectroscopy near 515 nm, Proceedings. Conference on Precision Electromagnetic Measurements Digest. – London, June 2004.
3. **Karlsson H., Laurell F.** Electricfield poling of flux grown KTiOPO4. – Appl. Phys. Lett., 1997, v.71 (24), p.3474.
4. **Reither G., Schaefer M., Lipp P.** PKCα: a versatile key for decoding the cellular calcium toolkit, Journal of Cell Biology, 2006, v.174, p.521– 533.
5. **Kaestner L., Lipp P.** Towards Imaging the Dynamics of Protein Signalling.– In: S.L. Shorte, F. Frischknecht (Eds.).– Imaging Cellular and Molecular Biological Function, 2007. – Springer, p. 283–306


to eYFP, after a physiological stimulus with ATP, is shown (figure 6). Also here the host cells, expressing the fusion protein, were COS-1 cells. The interpretation and relevance of this process go beyond the scope of this article (for more information see e.g. [4, 5]). It is nonetheless clear from this demonstration, that dynamic processes in living cells can now successfully be analyzed in systems using a DPSS laser optimised for eYFP.

## OUTLOOK

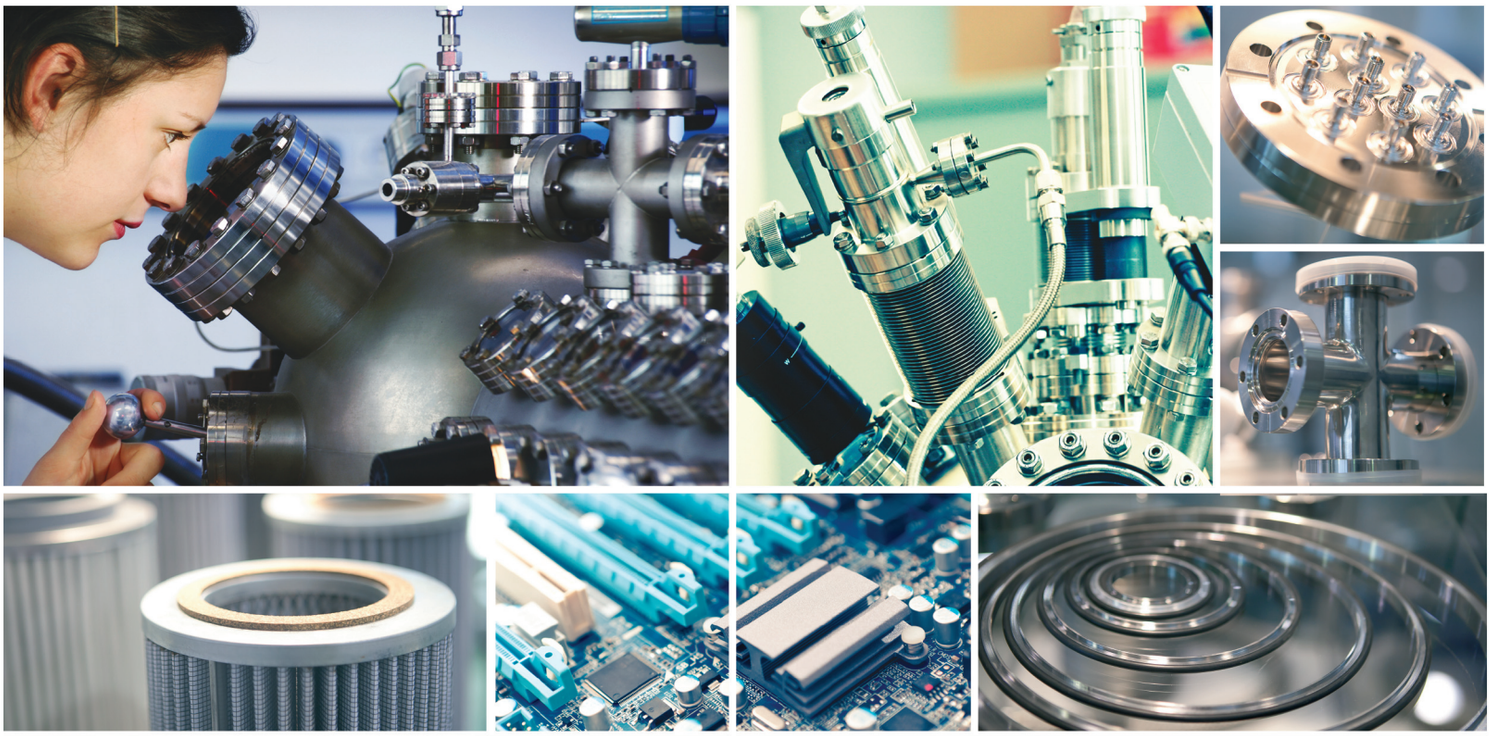
Far more important applications for this laser (than these examples using single staining of YFP) will be for quantitative parameter determination, using the to date widespread constructs with cyan fluorescent protein CFP. This is relevant for intra-molecular FRET microscopy e.g. with "Cameleons" (such as Premo cameleon, cf. figure 1) or kinase sensors, intermolecular FRET for the detection of receptor bindings or other molecular interactions. ■

# Вакуум ТехЭкспо

## 9-я Международная выставка вакуумной техники, материалов и технологий

**15–17 апреля 2014 года**
**Москва, КВЦ «Сокольники»**

**единственная в России и СНГ** | **выставка вакуумной отрасли**



**забронируйте стенд на сайте** | **www.vacuumtechexpo.com**

- вакуумная техника и технологии
- сублимационное оборудование
- криогенное оборудование
- аналитическое оборудование, работающее в вакуумной среде
- оборудование и технологии для нанесения функциональных покрытий

Реклама

Организатор:

MVK
В составе группы компаний ITE

Тел.: +7 (495) 935 81 00
E-mail: vacuumtechexpo@ite-expo.ru

При поддержке:

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ВАКУУМНОЙ ТЕХНИКИ ИМ. С.А. ВЕКШИНСКОГО

Генеральный спонсор:

INTECH