



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2008 048 618 B3** 2009.12.10

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2008 048 618.3**

(22) Anmeldetag: **23.09.2008**

(43) Offenlegungstag: –

(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **10.12.2009**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/48** (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Universität zu Lübeck, 23562 Lübeck, DE

(74) Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 24105 Kiel

(72) Erfinder:
Vogel, Alfred, Prof., Dr., 23568 Lübeck, DE; Gebert, Andreas, Prof., Dr., 23552 Lübeck, DE; Blessenohl, Maike, Dr., 19217 Utecht, DE; Eckert, Sebastian, 03185 Tauer, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

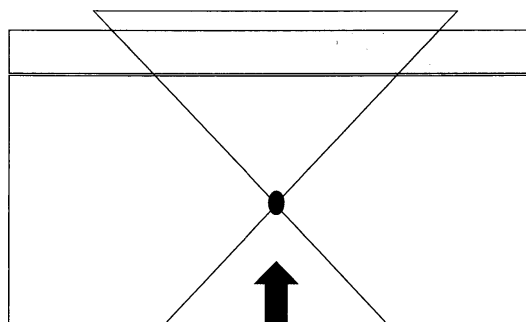
US 2007/02 92 312 A1

US 2003/00 71 269 A1

WO 2004/0 37 968 A2

(54) Bezeichnung: **Verfahren zum laser-induzierten Transport von Materialien von einem transparenten Trägersubstrat**

(57) Zusammenfassung: Verfahren zum laser-induzierten Transport eines Materials in ein Auffanggefäß mittels gepulstem Laserlicht, wobei das Material auf einer Seite eines für das Laserlicht transparenten Substrats angeordnet ist und das Laserlicht von einer dem Material abgewandten Seite des Substrats her in das Substrat eingestrahlt wird, mit den folgenden Schritten: Fokussieren des gepulsten Laserlichts in das Innere des Substrats derart, dass der Laserfokus einen vorbestimmten Abstand zur mit Material beladenen Seite des Substrats aufweist, Erzeugen eines Plasmas im Laserfokus durch nicht-lineare Absorption des Laserlichts, und Herauslösen und Beschleunigen des dem Laserfokus nächstgelegenen Materialteils in Richtung auf das Auffanggefäß durch den Impulsübertrag einer vom Laserfokus ausgehenden, den vorbestimmten Abstand zur mit Material beladenen Seite des Substrats durchlaufenden Stoßwelle.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren für den laserinduzierten Transport von Materialien, insbesondere von biologischen Materialien wie Einzelzellen oder Gewebeproben, von transparenten Trägersubstraten in Auffangvorrichtungen.

[0002] Separation und Transport kleiner biologischer Proben (Durchmesser von etwa 10 bis über 100 Mikrometer) sind von Interesse beispielweise bei der Untersuchung histologischer Schnitte, aus denen bestimmte Gewebsareale- oder Zelltypen zur weiteren Analyse herauspräpariert werden sollen. Das Bearbeiten mit mechanischen Manipulatoren birgt dabei stets das Risiko einer Kontamination der Probe durch Stoffe, mit denen der Manipulator vorher oder zwischenzeitlich in Kontakt war und ist überdies zeitraubend und kaum automatisierbar. Für die Entnahme einer großen Zahl von Proben aus einer biologischen Masse (histologischer Gewebeschnitt, Zellteppich, usw.) ist die rechnerunterstützte Selektion mit begleitendem laserinduziertem Transport des Probenmaterials Stand der Technik. Dabei wird die Probe mit einem fokussierten, gepulsten Laserstrahl abgerastert und die so ausgewählten Bereiche werden durch Applikation einer hinreichend großen Pulsenergie herausgeschleudert („katapultiert“), wobei eine Auffangvorrichtung (z. B. der Deckel des Analysegefäßes oder eine Mikrotiterplatte) in der vorhersehbaren Flugbahn der Probe angeordnet ist.

[0003] In einem Aufbau zum „Laser Pressure Catapulting“ (LPC) nach der Lehre der DE 196 16 216 A1 befindet sich die biologische Masse auf einem transparenten Substrat (etwa ein Glasobjektträger) und wird durch dieses Substrat hindurch mit einem Laser bestrahlt. Hierbei handelt es sich meistens um einen UV-Laser, da dessen Strahlung von biologischen Materialien gut absorbiert wird. Durch die Laserbestrahlung wird eine Probe aus der Masse herausgeschnitten und danach durch einen auf die Probenunterseite gerichteten „Transportpuls“ direkt aufgeheizt und teilweise verdampft. Die laserinduzierte Dampfexpansion dient hier als Triebkraft des Transports. Das Katapultieren direkt von Glas ist allerdings schädlich für das biologische Material (Vogel A et al. (2007) Mechanisms of Laser-Induced Dissection and Transport of Histologic Specimens, Biophysical Journal 93: 4481–4500), da im bestrahlten Areal thermomechanische Schädigungen auftreten und die UV-Strahlung in hoher Dosis auf das Material einwirkt. Die Ausbeute an verwertbarem genetischen Material für eine „quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction“ (qRT-PCR) Analyse ist um einen Faktor von etwa 100–1000 geringer als mit Verfahren, die eine Unterstützung des Katapultierens durch zusätzliche Schichten zwischen Substrat und Probe vorsehen.

[0004] Die DE 196 03 996 C2 offenbart ein Verfahren zum Separieren und Sortieren von biologischen Objekten, die auf einem planaren Träger angeordnet sind, wobei ein Objektfeld des Trägers, auf dem sich ein selektiertes biologisches Objekt befindet, mit einem Laserstrahl ausgeschnitten und sodann laserinduziert transportiert wird. Der Träger wird also als Bestandteil der Probe behandelt und mit ihr katapultiert. Die biologische Probe wird durch die mechanische Stabilität des Trägers vor und während des Transports gestützt. Zudem wird der Laserpuls, der den Transport auslöst, auf den Träger gerichtet, der durch lokale Verdampfung die erforderliche Energie zur Beschleunigung des Dissektats freisetzt. Die biologische Probe selbst, die sich im Innern einer geschlossenen Laserschnittlinie befindet, die ein Areal sehr viel größer als der Laserfleck umschließen kann, wird in allen Bereichen außerhalb des Laserfokus von der UV-Strahlung und der Wärmeentwicklung im Laserfokus nicht beeinträchtigt.

[0005] Der Träger aus der DE 196 03 996 C2 ist heute kommerziell erhältlich und besteht aus einer dünnen Folie aus Polyethylen-2,6-naphthalat (PEN). Die PEN-Folie ist nur an ihren Rändern auf dem Objektträger fixiert, wodurch die Proben nach Ausschneiden der relevanten Bereiche des Gewebes lose aufliegen und sehr leicht zu katapultieren sind. Die fehlende Haftung der Folie und ihr hohes Absorptionsvermögen im Bereich der Laserwellenlänge gestatten, das Dissektat auch bei Beleuchtung nur eines Bruchteils der ausgeschnittenen Fläche zu katapultieren.

[0006] Allerdings ist die Verwendung der PEN-Folie nicht ohne Nachteile. Durch die Folie wird die optische Abbildungsleistung verringert (und damit z. B. die Erkennbarkeit histologischer Details). Streuung und Doppelbrechung begrenzen die Möglichkeit der optischen Kontrastierung durch Phasen- oder Interferenzkontrast. Ferner besitzt die Folie eine erhebliche Autofluoreszenz im blauen und grünen Spektralbereich, sodass grüne Fluoreszenzmarkierungen zur Erkennung relevanter Gewebebereiche nur bedingt und blaue überhaupt nicht angewendet werden kann.

[0007] Häufig wird die Folie nicht komplett geschnitten und klappt beim Katapultierprozess lediglich um, sodass kein Gewebe in die Auffangvorrichtung gelangt. In der Praxis ist somit keine Automatisierung der Gewinnung histologischen Materials möglich, da es einer ständigen Kontrolle bedarf, ob auch alle zu katapultieren-

den Dissektate tatsächlich katapultiert wurden bzw. in das Auffanggefäß gelangt sind. Vor allem aber zeigt die Folie eine schlechte Planlage, welche nach Durchlaufen der histologischen Bäder und Färbelösungen noch weiter verschlechtert wird, so dass bei der praktischen Anwendung ständig nachfokussiert werden muss. Dieses Problem ist hauptsächlich der Tatsache geschuldet, dass die PEN-Folie im Innenbereich nicht am Objektträger anhaften, von diesem also auch nicht in Position gehalten werden kann, da sie sonst nicht zu katapultieren wäre.

[0008] Die erwähnten Nachteile der PEN-Folie werden weitgehend vermieden, wenn das Transportsystem ein stabiles, für Laserlicht transparentes Substrat und eine auf diesem ganzflächig anhaftende Funktionsschicht umfasst (siehe die nicht vor Veröffentlichte DE 12 2008 026 727 B3). Das Substrat ist dabei vorzugsweise ein herkömmlicher Glasobjektträger, und die Haftung zwischen Funktionsschicht und Substrat garantiert eine gute Planlage. Die Funktionsschicht ist zwischen 1 und 10 Mikrometer dick und unterteilt sich in wenigstens zwei übereinander angeordnete Teilschichten. Unmittelbar auf dem Substrat ist eine Treiberschicht angeordnet, die ein hohes Absorptionsvermögen für das Laserlicht besitzt und in der Lage ist, durch laserinduzierte Gasfreisetzung lokal zu expandieren. Auf der Treiberschicht ist eine Trägerschicht angeordnet, auf die das biologische Material aufgebracht wird, wodurch das biologische Material mitsamt einem Trägerschichtfragment katapultiert wird.

[0009] Die weiter zu nennende US 2007/029 2312 A1 stellt sich zudem die Aufgabe, einen Probenträger („plate“) für biologische Proben vorzustellen, auf dem das Probenmaterial lokal untersucht („addressable analyses“) und bei Bedarf an vorab festgelegten Entnahmeorten isoliert werden kann. Eine Adressierbarkeit der Entnahmeorte wird durch vorinstallierte Pallets erreicht, die in definierter Anordnung auf einer Glasoberfläche haften.

[0010] Diese Pallets können beispielsweise durch einen Laserpuls abgelöst werden, der in die Grenzfläche zwischen Glasoberfläche und Pallet fokussiert wird und dort ein Plasma bildet. Das Pallet wird also zwingend zusammen mit dem Probenmaterial isoliert. Dabei wird das abgelöste Pallet lediglich einer Flüssigkeitsströmung zum Transport übergeben. Ein nach der Lehre dieser Schrift vorstrukturierter Probenträger erfordert einen geringen Herstellungsaufwand und erlaubt gleichwohl doch keine Entnahme von Probenarealen, die man etwa bei der Inspektion eines flächigen Probenmaterials (z. B. histologischer Schnitt) an einer beliebigen Stelle zu isolieren wünscht, wenn kein passend angeordnetes Pallet vorhanden ist.

[0011] Beide genannten Verfahren, PEN-Folien-Technik und Funktionsschicht-Methode, sind geeignet, Dissektate zu selektieren und zu transportieren, die deutlich größer sind als das laserbestrahlte Areal. In beiden Fällen bleibt der größte Teil des biologischen Materials von der Laserstrahlung unbeeinflusst, so dass hier vor allem auch der Transport lebender Zellen oder Zellhaufen möglich ist.

[0012] Die Verwendung von mit PEN-Folie bespannten oder mit mehreren Funktionsschichten versehenen Objektträgern wäre für den histopathologischen Routinebetrieb vermutlich zu kostspielig. Sie wäre nach oben Gesagtem auch nicht in allen Fällen für die Untersuchung günstig. Überdies sind nach wie vor auch histologische Archivmaterialien zu untersuchen, bei denen die histologischen Schnitte üblicherweise ohnehin direkt auf einem Glas-Objektträger aufgebracht sind.

[0013] Oft ist man am Transport lebender Zellen auch gar nicht interessiert. Will man z. B. nur eine genetische Analyse des biologischen Materials in einem Areal eines histologischen Schnittes vornehmen, so rastert man dieses Areal mit einer Vielzahl von Laserpulsen ab und sammelt die Probenstücke in einem Auffangbehälter, wobei man nicht nur das mechanische Zerreißen der Zellmembranen während des Transports in Kauf nimmt, sondern dieses sogar für die Untersuchungszwecke als förderlich ansieht. Derartige Proben müssen also nicht vor mechanischen, gleichwohl aber dennoch vor thermischen und UV-bedingten Schäden geschützt werden.

[0014] Ferner ist als Stand der Technik noch die US 6 291 796 B1 zu erwähnen, die ein Verfahren zur Säuberung von Objekten mittels gepulster Laserstrahlung („laser dry cleaning“) beschreibt. Die auf einer Objektberfläche befindlichen Verunreinigungen – die nicht selten organisch sind – werden durch eine Kombination von Laserablation, photoinduzierter Zersetzung und laserpulsinduzierter Vibration des Objekts entfernt, wobei das Objekt durch lineare Absorption der Laserpulse wiederkehrend thermisch expandiert wird.

[0015] Es ist nun die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zum laser-induzierten Transport eines Materials, insbesondere eines biologischen Materials, von einem für das Laserlicht transparenten Trägersubstrat anzugeben, bei dem das Material vor der Laserstrahlung und vor thermischer Schädigung geschützt ist ohne dass es einer gesonderten Schutzschicht zwischen Trägersubstrat und Material bedarf.

[0016] Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Hauptanspruchs. Die Unteransprüche geben vorteilhafte Ausgestaltungen des Verfahrens an.

[0017] Der Ansatzpunkt der Erfindung ist, dass das transparente Substrat selbst – gemeinhin ein Glasobjektträger, der zwei ausgedehnte Flachseiten aufweist – dazu veranlasst werden soll, das auf einer Flachseite angeordnete biologische Probenmaterial an selektierten Stellen abzuwerfen und in das Auffanggefäß zu schleudern. Die Selektion, wo dieses Abwerfen geschehen soll, erfolgt durch Fokussierung eines gepulsten Laserstrahls in die Nähe des Probenmaterials. Das Probenmaterial soll vor dem Laserlicht geschützt werden, so dass eine Einstrahlung von der Flachseite mit der Probe her nicht zweckmäßig ist. Vielmehr muss das Laserlicht von der dem Probenmaterial abgewandten Flachseite des Substrats eingestrahlt werden und offenbar zweckmäßig das Substrat weitgehend durchlaufen können, bevor es zu einer Energiedeposition in der Nähe des Probenmaterials kommt. Die Energie muss überdies in einem Mindestabstand vor dem Probenmaterial deponiert werden, um die Schädigungen durch Wärme und Strahlung zu vermeiden. Die Laserstrahlung muss also im Innern des transparenten Substrats fokussiert werden, so dass die Energiedeposition durch nicht-lineare Absorption unter gleichzeitiger Plasmabildung stattfindet.

[0018] Eine solche Plasmabildung beschädigt das Substrat irreversibel. Der Bereich der Beschädigung kann dabei auf das Innere des Substrats begrenzt bleiben (analog zur Laserinnengravur) oder sich bis zur Substratoberfläche mit dem Probenmaterial fortsetzen. Es kann auch zur Absplitterung von Substratfragmenten kommen. Das Ausmaß der Substratschädigung ist für die Erfindung nicht entscheidend.

[0019] Erfindungswesentlich ist vielmehr, dass die Erzeugung eines Plasmas im Laserfokus unter der Substratoberfläche mit dem Probenmaterial das Aussenden einer Stoßwelle nach sich zieht. Die Stoßwelle breitet sich sphärisch vom Laserfokus aus und durchläuft insbesondere den vorbestimmten Abstand zwischen Laserfokus und Substratoberfläche, wobei sich der Druck abschwächt, der im Laserfokus zunächst sehr hoch ist. Der Abstand schützt das Probenmaterial nicht nur vor der sehr hohen Plasmatemperatur, sondern er erlaubt auch das „Auffächern“ der Druckbeaufschlagung des Probenmaterials durch die expandierende Stoßwelle. Wird die Stoßwelle an der Proben- oder Substratoberfläche reflektiert, so findet ein Impulsübertrag auf das Probenmaterial statt, der bei geeigneten Laserparametern zum Ablösen, Abreißen und Beschleunigen eines Stücks des Probenmaterials in Richtung auf das Auffanggefäß ausreicht. Die so transportierte Probenfläche ist sehr viel größer als der Querschnitt des Laserfokus.

[0020] Es ist eine vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung, den Laserfokus vollautomatisch zwischen den Laserpulsen neu zu platzieren. Er behält dabei vorzugsweise einen vorbestimmten Abstand zur Oberfläche bei und wird lediglich parallel zu dieser verschoben. Von Laserpuls zu Laserpuls wird somit neues Material transportiert, d. h. es findet ein laterales Abrastern des Probenmaterials statt. Durch dieses Abrastern können ausgewählte Bereiche des Probenmaterials mit beliebiger Gestalt transportiert werden.

[0021] Das erfindungsgemäße Verfahren ist das derzeit einzige Verfahren zum Laser-induzierten Materialtransport, dass sich allein auf Energiedeposition mittels nicht-linearer Absorption stützt. Dies hat einen weiteren gravierenden Vorteil: man ist bei der Wahl der Laserwellenlänge weitgehend frei. Insbesondere kommen alle Wellenlängen vom UV- bis zum NIR-Spektralbereich für den Transport in Frage. NIR-Wellenlängen sind dabei besonders interessant, da sie von biologischem Material kaum absorbiert werden.

[0022] Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Figuren näher erläutert. Dabei zeigt:

[0023] [Fig. 1](#) eine schematische Querschnittsansicht von verschiedenen Phasen der Vorgänge im transparenten, mit Probenmaterial beladenen Substrat bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens;

[0024] [Fig. 2](#) eine Skizze zur Betrachtung des größtmöglichen Probenareals, das mit dem erfindungsgemäßen Verfahren transportiert werden kann;

[0025] [Fig. 3](#) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche eines Glassubstrates, bei dem sich durch Fokussierung eines Laserpulses unter die Substratoberfläche verschiedene Typen von Beschädigungen an der Substratoberfläche gebildet haben.

[0026] [Fig. 4](#) ein Diagramm mit experimentellen Messungen der für den Transport eines bestimmten Areal von Probenmaterial erforderlichen Laserpulsenergie in Abhängigkeit vom Abstand zwischen Laserfokus und Substratoberfläche, wobei verschiedene Proben transportiert werden und die mögliche Beschädigung der Substratoberfläche untersucht wird;

[0027] [Fig. 5](#) ein Balkendiagramm mit der für eine bestimmte Signalstärke erforderlichen Anzahl von PCR Zyklen für ein Housekeeping-Gen, wobei zwei Verfahren nach dem Stand der Technik (Katapultieren mit PEN-Folie und Katapultieren direkt vom Glas) miteinander verglichen werden.

[0028] [Fig. 6](#) ein Balkendiagramm analog zu [Fig. 5](#), wobei hier für drei verschiedene Housekeeping-Gene das erfindungsgemäße Verfahren mit der PEN-Folien-Technik verglichen wird.

[0029] In transparenten Stoffen wie z. B. Glas, Quarz oder anderen möglichen Substratmaterialien kann eine lokalisierte Energiedeposition nur durch nichtlineare Absorption erfolgen, d. h. durch Mehrphotonenprozesse in der Form von Multiphotonenionisation und Lawinenionisation, die zur Ausbildung eines Plasmas führen (quasifreie Ladungsträger im Material bestehend aus einer Mischung von Elektronen und Ionen). Da das Auftreten der Mehrphotonenprozesse nichtlinear von der Laserlichtintensität abhängt, spricht man von „nichtlinearer Absorption“. Und da die Plasmabildungsrate oberhalb einer Schwelle, die von Material und Laserparametern abhängt, extrem stark zunimmt, wird der Plasmabildungsprozess in diesem Parameterbereich auch „optischer Durchbruch“ genannt.

[0030] Die hohe volumetrische Energiedichte innerhalb des Plasmas geht mit der Erzeugung hoher Temperaturen von etlichen Tausend Kelvin und hoher Drücke im Bereich von 1 bis 10 GPa einher (Vogel et al., „Shock wave emission and cavitation bubble generation by picosecond and nanosecond optical breakdown in water,” J. Acoust. Soc. Am. 100: 148–165, 1996). Dies führt zu einer explosionsartigen Ausdehnung des Plasmavolumens und zur Aussendung einer Stoßwelle. Bei sphärischen Stoßwellen nimmt die maximale Druckamplitude mit wachsendem Radius ab.

[0031] Eine Stoßwelle besitzt eine vom Drucksprung P an der Stoßfront und dem Druckverlauf innerhalb der Stoßwelle abhängige Partikelgeschwindigkeit u_p und dementsprechend auch einen Impuls. Der Impuls pro Einheitsfläche einer sphärischen Stoßwelle mit Radius r beträgt (Cole, „Underwater Explosions”, Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 1948, p. 112)

$$(1) \quad I(r, t') = \int_0^{t'} P(r, t) dt,$$

wobei t' der Stoßwellendauer entspricht. Die Stoßwelle wird an der freien Oberfläche des Substrates (bzw. an der darauf liegenden Probe) als Zugwelle mit Amplitude $-P$ an der Stoßfront reflektiert. Hierbei wird die Materialoberfläche innerhalb der Anstiegszeit der Stoßfront auf die Geschwindigkeit (Cole, „Underwater Explosions”, Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 1948, p. 54)

$$u_g = 2u_p \cos \alpha \quad (2)$$

beschleunigt, wobei α der Einfallswinkel der Stoßwelle ist (Winkel zwischen Wellenfront und Substratoberfläche bzw. zwischen Ausbreitungsrichtung und Oberflächennormale, $\alpha = 0^\circ$ für senkrechten Einfall). Diese Geschwindigkeit wird auch auf das Material übertragen, welches sich auf der Substratoberfläche befindet.

[0032] Die Zugwelle bricht das Substratmaterial auf, sofern sie an irgendeinem Ort im Material dessen Zugfestigkeit überschreitet („Spallation”). Wird die Zugfestigkeit nirgends überschritten, führt der Durchlauf der Stoßwelle lediglich zu einer reversiblen vorübergehenden elastischen Verformung. Auf ähnliche Weise bildet sich auch die Auslenkung der Substratoberfläche bei Stoßwellenreflektion durch die elastischen Rückstellkräfte im Material wieder zurück.

[0033] Wenn auf dem Substrat eine Schicht eines Probenmaterials lose oder mit geringer Adhäsion aufliegt, bildet die Grenze zwischen Probe und Substrat eine Sollbruchstelle für den Spallationsvorgang.

[0034] Es kommt in dem Bereich zu einer Ablösung der Probe, wo die senkrecht zur Oberfläche gerichtete Komponente der Spallationskräfte sowohl die Adhäsion zum Substrat als auch die Zerreißfestigkeit zu benachbarten Probenteilen übersteigt.

[0035] Werden durch das Zusammenwirken der Zugwelle und des hohen Gasdrucks im Plasmabereich Verformungskräfte erzeugt, welche nicht nur die Adhäsionskräfte an der Sollbruchstelle zwischen Substrat und Probe, sondern auch die Festigkeit des Substratmaterials übersteigen, kann Substratmaterial im Bereich oberhalb des Plasmas herausgebrochen werden, wobei im Bereich direkt oberhalb des Plasmas die Spallationswirkung durch das Aufschmelzen des Materials erleichtert wird. Geschmolzenes Substratmaterial kann aus der

unmittelbaren Plasmanähe durch den hohen Druck im Plasmabereich an die Oberfläche des erzeugten Kraters oder bis auf die Substratoberfläche in der Umgebung des Kraters gelangen. Da dies aber deutlich nach Ablösen der Probe von der Substratoberfläche erfolgt, kann das Probenmaterial durch die Schmelze thermisch nicht geschädigt werden.

[0036] Die vorstehende Diskussion verdeutlicht die Analogie des erfindungsgemäßen Verfahrens zu einer unterirdischen Sprengung. Das Laserlicht wird im Innern des transparenten Substrats in einem vorbestimmten Abstand zur Substratoberfläche („depth of burial“) fokussiert. Das biologische Material auf der Substratoberfläche wird weit außerhalb des Laserfokus kaum von der Laserstrahlung beeinträchtigt. Die Erzeugung des Plasmas durch nichtlineare Absorption entspricht der Fernzündung eines Sprengsatzes. Das zwischen Laserfokus und Oberfläche befindliche Substratmaterial wirkt als Vermittler eines durch die Plasmaexpansion getriebenen Impulsübertrages auf das auf der Substratoberfläche angeordnete biologische Material, das es zu beproben gilt. Das Substratmaterial dient zugleich als Schutzschicht gegen thermische Schädigung der Probe. Wenigstens ein Teil des biologischen Materials wird vom Substrat abgehoben und in ein Auffanggefäß transportiert, gegebenenfalls zusammen mit ausgebrochenen Fragmenten des Substratmaterials. Es kann ein Krater auf der Substratoberfläche entstehen. Das Substrat wird auf jeden Fall – zumindest im Innern – irreversibel beschädigt. Die maximale Tiefe des Auswurfkraters wird bei spröden Materialien wie Felsen oder Glas erreicht, wenn Spallation und Beschleunigung durch den Gasdruck mit gleichen Anteilen zur Kraterbildung beitragen.

[0037] Im Falle des Heraussprengens von Substratmaterial wird dieses zusammen mit der Probe in das Auffanggefäß transportiert. Wenn das Substratmaterial inert gegenüber den bei der genomischen oder proteomischen Analyse relevanten biochemischen Prozessen ist, hat die Vermischung von Proben- und Substratmaterial keinen nachteiligen Einfluss auf das Analyseergebnis. Dies ist beispielsweise bei Glas und etlichen Polymeren (z. B. PEN) der Fall. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist es also nicht wesentlich, ob Fragmente des Substrats mit transportiert werden oder nicht. Das Verfahren weist hohe Stabilität gegenüber Variationen der Prozessdynamik auf, was zur Folge hat, dass es mit sehr unterschiedlichen Bestrahlungsparametern angewendet werden kann.

[0038] Die Größe des transportierten Probenareals entspricht dem Bereich, wo der Impulsübertrag auf die Probe hinreichend groß ist, um es vom benachbarten Probenmaterial zu lösen, die Adhäsion zur Substratoberfläche zu überwinden, und es auf eine Startgeschwindigkeit zu beschleunigen, die zum Überwinden der Distanz zum Auffanggefäß entgegen Gravitationskraft und Luftreibung ausreicht.

[0039] Es kann vereinfacht eine Mindestgeschwindigkeit u_{\min} der Probe als Transportschwelle definiert werden. Der Bereich, in dem Probenmaterial transportiert wird, ist dann durch die Bedingung

$$u_g = 2u_p \cos\alpha > u_{\min} \quad (3)$$

gegeben. Das transportierte Areal wird von einer geschlossenen Kreislinie ($\alpha = \alpha_R$) umrandet, wo die Transportbedingung

$$2u_p \cos\alpha_R = u_{\min} \quad (4)$$

gerade erfüllt ist. Offenbar nimmt die linke Seite von (4) mit sinkendem Schalldruck der Stoßwelle oder mit steigendem Winkel der Stoßwellenfront gegen die Substratoberfläche ab. Bei vorgegebener Pulsenergie („Sprengkraft“) existiert grundsätzlich ein Optimum für den Abstand des Laserfokus von der Substratoberfläche mit dem Probenmaterial, das den Transport eines maximalen Probenareals ermöglicht. Dieses Optimum muss im Einzelfall aufgesucht werden, weil es von der konkreten Wahl des Substrats sowie von Haftung und Reißfestigkeit der Probe abhängt.

[0040] Rein geometrisch bedingt fällt der Schalldruck mit wachsendem Abstand r von einer Punktquelle mit $1/r$ ab. Der Druck an der Front einer Stoßwelle fällt jedoch deutlich schneller ab, weil an der Stoßfront Energie in Wärme umgewandelt wird, und weil sich die Stoßwelle während der Ausbreitung verbreitert. Es gilt $p \propto r^{-n}$, mit $1.1 < n < 2.5$. Für den Druckabfall im Nahfeld (gemessen bis etwa $r = 60 \mu\text{m}$) eines durch einen 50- μJ , 30-ps Puls erzeugten Plasmas gilt $1.6 < n < 2.2$ (Vogel et al., „Shock wave emission and cavitation bubble generation by picosecond and nanosecond optical breakdown in water,“ J. Acoust. Soc. Am. 100: 148–165, 1996).

[0041] Hieraus folgt, dass das maximale, für eine vorbestimmte Pulsenergie noch transportierbare Probenareal durch einen Winkel $\alpha_R < 45^\circ$ gekennzeichnet sein muss (siehe auch Diskussion weiter unten), d. h. der Abstand des Laserfokus zur Substratoberfläche sollte vorzugsweise immer größer sein als der gewünschte

Radius des transportierten Probenareals.

[0042] Der Minimalabstand zwischen Laserfokus und Substratoberfläche muss wenigstens so groß sein, dass die Probe durch Wärmeleitung nicht geschädigt werden kann. Dies ist bei Pulsdauern im Nanosekundenbereich bei einem Abstand von 3 μm mit Sicherheit der Fall.

[0043] Der Minimalabstand muss zusätzlich so groß sein, dass der Strahlquerschnitt an der Probe und die von der Stosswelle beaufschlagte Probenfläche deutlich größer sind als der Fokusbereich. Diese Bedingung ist erfüllt, wenn der Abstand mindestens gleich der Rayleigh-Länge z_R ist, innerhalb derer sich der Strahlquerschnitt verdoppelt. Wenn man die – für Laser meist zulässige – Näherung eines Gaußstrahls betrachtet, so lässt sich die Rayleigh-Länge wie folgt ausdrücken

$$(5) \quad z_R = \frac{\pi \omega_0^2}{\lambda},$$

wobei ω_0 der Strahlradius im Fokus und λ die Wellenlänge des verwendeten Lichts ist. Für sehr große numerische Aperturen, bei denen $z_R < 3 \mu\text{m}$ sein kann, sollte der Minimalabstand für den erfindungsgemäßen Transport gleichwohl – wie oben erläutert – 3 μm betragen.

[0044] Die Laserwellenlänge muss in den Transmissionsbereich des Substratmaterials fallen, der beispielsweise bei Glas von der UV-A Region bis in den nahen Infrarotbereich des optischen Spektrums reicht. Da die Energiedeposition durch nichtlineare Absorption und Plasmabildung erfolgt, welche nur eine geringe Wellenlängenabhängigkeit aufweist, eignen sich prinzipiell alle Laserwellenlängen im Transmissionsbereich des Substratmaterials. Dies ist ein Vorteil gegenüber den Verfahren nach dem Stand der Technik, bei denen die linearen Absorptionseigenschaften des Probenmaterials und des jeweils verwendeten Schichtensystems berücksichtigt werden müssen. Die Möglichkeit, IR-Wellenlängen wie beispielsweise die Fundamentalwellenlänge des Nd:YAG Lasers (1064 nm) zu verwenden, kann zu einem zusätzlichen Schutz der zu transportierenden biologischen Proben führen, deren lineare Absorption üblicherweise im nahen IR viel geringer ist als bei UV-Wellenlängen.

[0045] Geeignete Laserpulsdauern liegen im Bereich von einigen Pikosekunden bis maximal etwa 100 ns. Bei Pulsdauern im Femtosekundenbereich weisen die lasererzeugten Plasmen nur eine geringe volumetrische Energiedichte auf, die zum Herausbrechen hinreichend großer Substratteile nicht ausreicht. Zudem ist die Lokalisierbarkeit der Energiedeposition durch nichtlineare Strahlausbreitungseffekte im Substrat eingeschränkt. Bei Verlängerung der Pulsdauer vergrößert sich sowohl die Energiedichte im Laserfokus als auch bekanntermaßen die Energieschwelle für Plasmabildung in transparenten Dielektrika. Bei Pulsdauern von 6 ns liegen die Durchbruchenergien in Wasser bei 22° Öffnungswinkel (NA = 0.25) bereits bei 140 μJ für $\lambda = 1064 \text{ nm}$ und 40 μJ für $\lambda = 532 \text{ nm}$. Energien in dieser Größenordnung erzeugen recht grobe Effekte im Substrat, die für eine präzise Abgrenzung der transportierten Bereiche der Probe nicht gut geeignet sind.

[0046] Besonders vorteilhaft und kostengünstig ist die Verwendung von Pulsen aus Mikrochiplasern mit einer Dauer zwischen etwa 300 ps und 3 ns.

[0047] Die Laserstrahlqualität muss möglichst gut sein, um die Energieschwelle für Plasmabildung im Laserfokus zu minimieren. Die Strahlqualität wird üblicherweise gemessen durch das Strahlparameterprodukt $\omega_0 \phi = M^2 (\lambda/\pi)$ aus dem Radius ω_0 der Strahlmitte und dem Fernfeldwinkel ϕ , wobei λ die Laserwellenlänge bezeichnet und M^2 die Beugungsmaßzahl ist. Bei einem idealen Laserstrahl haben Strahlqualität $K = 1/M^2$ und Beugungsmaßzahl den Wert 1, bei realen Laserstrahlen sind $M^2 > 1$ und $K < 1$. Mikrochiplaser emittieren üblicherweise Strahlung mit einer Beugungsmaßzahl $M^2 \leq 1.3$, sind also für die Erfüllung der Aufgabe ausgezeichnet geeignet.

[0048] In kommerziellen Mikrostrahlssystemen der ersten Generation werden üblicherweise Stickstofflaser zur Dissektion und zum Katapultieren verwendet. Die Strahleigenschaften von Stickstofflasern sind so schlecht, dass sich im Substratmaterial bei den üblicherweise zum Katapultieren verwendeten moderaten numerischen Aperturen ($10 \times$ und $20 \times$ Objektive mit $\text{NA} \leq 0.5$) kein optischer Durchbruch realisieren lässt. Wegen des Ausbleibens eines optischen Durchbruchs im Substrat wird die Laserenergie direkt in der Probe deponiert und der Transport erfolgt, wie bereits im Stand der Technik geschildert, durch Verdampfen eines Teils der Probe. Dies geht mit Schäden an der Probe einher. Stickstofflaser oder andere Lasertypen mit schlechten Strahleigenschaften sind daher für das erfindungsgemäße Verfahren nicht geeignet.

[0049] Die numerische Apertur (NA) des zur Verwendung der Laserstrahlung verwendeten Objektivs kann im Bereich $0.2 \leq NA \leq 1.3$ liegen. Je größer dabei der Kegelwinkel der Laserstrahlung eingerichtet wird, desto geringer ist bei vorgegebenem Abstand zwischen Fokus und Probe die Belastung der Probe. Eine effektive NA, die kleiner als die nominelle NA des Objektivs ist, ergibt sich dann, wenn die rückwärtige Eintrittspupille des Objektivs durch den Laserstrahl nicht vollständig ausgeleuchtet wird. Numerische Aperturen bis 0.75 können nach dem Stand der Technik mittels Long-Distance Objektiven mit Korrekturausgleich in Verbindung mit 1 mm dicken Glas-Substraten realisiert werden. Zur Realisierung von größeren Aperturen bis $NA = 1.4$ müssen Öl-Immersionsobjektive in Verbindung mit einem etwa 0.1–0.2 mm dicken Deckglas als Substrat verwendet werden.

[0050] Die minimale Laserpulsenergie für den laserinduzierten Transport ist durch die zur Plasmabildung innerhalb des Substratmaterials mindestens erforderliche Energieschwelle E_{th} gegeben. Diese wird durch Erzeugung eines permanenten Schadens/Defektes im Substratmaterial definiert. Bei Fokussierung des Lasers im Minimalabstand $d_{min} = 3 \mu\text{m}$ unter der Substratoberfläche reicht der durch Plasmabildung erzeugte Defekt nach allen bisherigen Befunden immer bis zur Substratoberfläche. Somit lässt sich die Minimalenergie leicht durch anschließende Inspektion der Oberfläche experimentell bestimmen.

[0051] Bei aberrationsminimierter Fokussierung von Laserpulsen mit ungefähr 1 ns Dauer und 355 nm Wellenlänge durch ein 1-mm Glassubstrat wird eine Energieschwelle von $E_{th} = 2,0 \mu\text{J}$ bei $NA = 0,6$ gemessen. Da die Schwellenwerte für den optischen Durchbruch in transparenten Dielektrika bei größeren NA nicht vom Fokussierungswinkel abhängen, kann man hieraus die Energieschwellen für Fokussierung bei anderen NAs berechnen. Man erhält beispielsweise:

NA	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4
E_{th} (μJ)	72	18	8,0	4,5	2,9	2,0	1,47	1,13	0,89	0,72	0,60	0,50	0,43	0,37

[0052] Der minimale Bedarf an Pulsenergie nimmt also mit steigender NA erheblich ab. Ab etwa $NA = 0.2$ können kostengünstige Mikrochiplaser verwendet werden, deren maximale Pulsenergie recht begrenzt ist. Die vorstehende Tabelle macht deutlich, dass Laserpulsenergien von etwa 0.3 bis zu 100 μJ für die Ausführung der Erfindung in Betracht kommen.

[0053] Es ist vorteilhaft, Pulsenergien deutlich oberhalb der Schwelle des optischen Durchbruchs zu verwenden, da dies eine höhere Absorption der Strahlung im Fokus und somit eine effektivere Energiedeposition mit sich bringt.

[0054] Die Pulsenergie ist grundsätzlich zu erhöhen, wenn man den Laserfokus weiter von der Substratoberfläche entfernt wählt. Wie bereits erwähnt, sollten für jede bestimmte Wahl von Substrat- und Probenmaterial Vorexperimente durchgeführt werden, bei denen insbesondere Pulsenergien und Fokustiefe variiert werden, um den Bereich des optimalen Proben transports aufzusuchen.

[0055] Die minimalen lateralen Abstände zwischen den einzelnen Laserexpositionen bei der Abrasterung der biologischen Probe ergeben sich aus dem Bereich der Probe, wo der Impulsübertrag durch Stoßwelle und/oder herausgebrochenes Substratmaterial hinreichend groß ist, um die Probe reproduzierbar aus dem umliegenden Probenmaterial herauszulösen und in Richtung Auffanggefäß zu beschleunigen. Große Abstände zwischen den Rasterpunkten in Verbindung mit einer hohen Repetitionsrate der Laserpulse beschleunigen die Geschwindigkeit der Probengewinnung. Die Abstände der Rasterpunkte sollten aber vorzugsweise nicht größer sein als der doppelte Abstand des Laserfokus von der Substratoberfläche mit dem Probenmaterial.

[0056] Im folgenden wird ein Ausführungsbeispiel, an dem sich die Leistungsfähigkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens zum schonenden Materialtransport ablesen lässt, erläutert.

[0057] [Fig. 1](#) zeigt schematische Querschnitte durch ein transparentes Substrat (gepunktet) mit einem darauf angeordneten Film aus Probenmaterial (unterbrochen schraffiert), das nur relativ schwach am Substrat haftet.

[0058] In [Fig. 1a](#) zeigt der Pfeil die Einstrahlrichtung des Laserlichts an, die Kegellinien deuten den Strahlquerschnitt an, der im Laserfokus (dunkles Oval) minimal wird. Erfindungsgemäß besitzt der Laserfokus deutlichen Abstand zur Substratoberfläche.

[0059] In [Fig. 1b](#) ist eine Momentaufnahme der Ausbreitung einer Stoßwelle zu sehen, die durch Plasmabil-

ung im Laserfokus zuvor ausgelöst wurde. Vom Fokus ausgehend breitet sich die Stoßwelle zunächst sphärisch aus. Erreicht sie eine freie Oberfläche, wird sie dort reflektiert und in eine Zugwelle umgewandelt, wobei ein Impuls übertragen wird. Eine Beschleunigung des Probenmaterials findet dort statt, wo der Impulsübertrag auf den Probenfilm durch den Stoß ausreicht, die Haftung der Probe am Substrat zu überwinden. In der [Fig. 1b](#) wird vereinfacht unterstellt, dass die akustische Impedanz in Substrat und Probenmaterial identisch sind. Dies ist in der Regel nicht der Fall, so dass die Stoßwelle größtenteils bereits an der Grenzfläche Substrat/Probe reflektiert wird. Gleichwohl ist auch dann durch die Bewegung der Substratoberfläche ein Impulsübertrag auf die Probe möglich.

[0060] Das Ablösen und Abheben eines Teils des Probenfilms wie in [Fig. 1c](#) gezeigt erfolgt dann, wenn der Impulsübertrag bereichsweise groß genug ist, außer der Haftung auch den Zusammenhalt des Probenfilms zu überwinden. Dies wird durch gezackte Risskanten im Probenfilm angedeutet. Das abgehobene Probenstück wird in Richtung auf das Auffanggefäß beschleunigt.

[0061] Anhand von [Fig. 2](#) kann verdeutlicht werden, welcher maximale Probenradius b_{\max} bei einer vorgegebenen Fokustiefe d in Vorwärtsrichtung senkrecht zur Substratoberfläche abgehoben werden kann. In der Zeichnung ist das Substrat S allein durch seine Oberfläche (dicke Linie) angedeutet, und der Laserfokus P befindet sich im Abstand d zu dieser Oberfläche im Innern des Substrats.

[0062] Der Randbereich der Probe (Probenmaterial in [Fig. 2](#) nicht dargestellt) ist gerade durch die Bedingung gekennzeichnet, dass die Stoßwellenfront dort den Winkel α_R mit der Substratoberfläche einschließt. Wie bereits erwähnt gilt dort gerade (vgl. Gleichung (4))

$$2u_p \cos \alpha_R = u_{\min} \quad (6)$$

und wenn man annimmt, man hätte

$$(7) \quad u_p(d^*) = \frac{C}{d^*} \quad \text{mit} \quad C = \text{konstant},$$

dann wäre wegen

$$\cos \alpha_R = \frac{d}{d^*}$$

am Rand der Probe

$$(8) \quad 2 \frac{C}{d^*} \frac{d}{d^*} = u_{\min} \quad .$$

[0063] Daraus folgt mit

$$d^* = \sqrt{b^2 + d^2}$$

für den Radius b des transportierten Areals

$$(9) \quad b(d) = \sqrt{\frac{2Cd}{u_{\min}} - d^2} \quad .$$

[0064] Die Ableitung von b nach d ist

$$(10) \quad b' = \frac{1}{2} \left(\sqrt{\frac{2Cd}{u_{\min}} - d^2} \right)^{-1} \left(\frac{2C}{u_{\min}} - 2d \right),$$

und die Funktion $b(d)$ nimmt somit ein Maximum ($b' = 0$) an für

$$(11) \quad d = \frac{C}{u_{\min}} \quad .$$

[0065] Einsetzen von (11) in (9) liefert $b_{\max} = d$. Tatsächlich fallen aber, wie weiter oben erläutert, die Druckamplitude und damit die Partikelgeschwindigkeit der Stoßwelle (für moderate Drucksprünge kann Proportiona-

lität unterstellt werden) schneller ab als in (7) angenommen. Dadurch lässt sich (6) nur noch für kleinere Winkel als 45° optimal erfüllen lässt, und es gilt somit $b_{\max} < d$.

[0066] Die Tiefe des Laserfokus im Substrat sollte also vorzugsweise größer als der gewünschte Radius des transportierten Probenareals gewählt werden. Dabei ist natürlich zu beachten, dass man bei Vorgabe des Probenradius auch die Fokustiefe und die Laserpulsenergie geeignet aufeinander abzustimmen hat, damit ein ausreichender Impulsübertrag auf die Probe möglich ist.

[0067] Es kann vorkommen, dass die Plasmabildung im Laserfokus zur Beschädigung der Substratoberfläche führt. Bei relativ geringen Fokustiefen ist der optische Durchbruch im Fokus in der Regel mit solchen Beschädigungen verbunden und führt sogar nicht selten zum Heraussprengen größerer, kegelförmiger Fragmente des Substratmaterials. [Fig. 3a](#) zeigt eine Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme eines Kraters im Substrat, nachdem ein solches Fragment entfernt worden ist. Die Morphologie des sichtbaren Schadens kann aber mit der Fokustiefe erheblich variieren, wie die [Fig. 3b](#) und c exemplarisch belegen.

[0068] Das Auftreten solcher Schäden an der Substratoberfläche ist für die Erfindung nicht wesentlich, was [Fig. 4](#) verdeutlicht. Im Diagramm sind der Abstand des Laserfokus zur Substratoberfläche auf der Abszisse und die für einen erfolgreichen Transport erforderliche Laserpulsenergie auf der Ordinate aufgetragen. Ein Transportexperiment wird hier als erfolgreich definiert, wenn beim lateralen Verschieben des Laserfokus ein Streifen des Probenmaterials mit definierter Breite vollständig transportiert werden kann. Dies impliziert sowohl die Wiederholbarkeit des Einzelpulstransports und prüft zugleich die Zweckmäßigkeit des Verfahrens für das Abrastern von Probenarealen, was die Hauptanwendung der Erfindung sein dürfte. Die Messergebnisse in [Fig. 4](#) beziehen sich auf ein $20 \times$ Objektiv und $NA = 0.5$. Die eingezeichneten Punkte markieren Parameter mit Transporterfolg für drei verschiedene Probenmaterialien, wobei alle aufgefundenen Parameter für ein Probenmaterial durch Linien miteinander verbunden sind. Die schraffierte Fläche kennzeichnet den Parameterbereich, in dem keine Schäden an der Substratoberfläche ausgemacht werden konnten. Die Aussage von [Fig. 4](#) ist die, dass bei den Laborexperimenten, in denen der Fokus bis zu etwa $45 \mu\text{m}$ unter der Substratoberfläche platziert wird, praktisch immer ein Schaden an der Oberfläche entsteht, so dass auch ein Transport von Substratmaterial nicht auszuschließen ist. Für Fokustiefen jenseits von $50\text{--}60 \mu\text{m}$ erreicht der erzeugte Plasmaschaden im Substrat nicht mehr die Oberfläche, es wird ausschließlich Probenmaterial bewegt. Bei einer derart tiefen Fokustiefe ($100 \mu\text{m}$ und mehr sind möglich) kann die thermische Schädigung der Probe völlig ausgeschlossen und die Belastung durch Laserstrahlung als marginal bezeichnet werden. Dabei kommt man immer noch mit moderaten Pulsenergien aus günstigen Laser aus.

[0069] Abschließend soll noch die Qualifizierung der Erfindung als schonendes Transportverfahren gezeigt werden.

[0070] Hierzu werden biologische Proben mit gepulstem Laserlicht von einem Träger abgerastert, und die gesammelten Proben werden einer RNA-Extraktion und -Analyse durch quantitative "Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction" (qRT-PCR) zugeführt. Die Anzahl an PCR-Zyklen, die erforderlich ist, um eine bestimmte Fluoreszenz-Signalstärke für bestimmte Gene zu erreichen, ist die signifikante Messgröße. Eine deutliche Erhöhung dieser Anzahl bei gleichem Ausgangsmaterial auf dem Träger bedeutet, dass der Transportprozess Materialschäden verursacht hat, welche die Analyse beeinträchtigen.

[0071] [Fig. 5](#) zeigt zunächst ausschließlich den Stand der Technik. Bei diesem Versuch werden Pulse eines Stickstofflasers mit etwa $10 \mu\text{J}$ Energie durch ein $10 \times$ Objektiv auf den auf dem Objektträger liegenden Gefrierschnitt fokussiert. Die Strahleigenschaften von Stickstofflasern sind, wie weiter oben geschildert, so schlecht, dass sich im Substratmaterial mit moderaten numerischen Aperturen ($NA \leq 0.5$) kein optischer Durchbruch realisieren lässt und somit die Laserenergie direkt in der Probe deponiert wird. Der Transport erfolgt also durch Verdampfen eines Teils der Probe (lineare Absorption), und die Wärmebelastung des angrenzenden Probenmaterials ist relativ hoch. Dieses Transportverfahren ist als „Katapultieren direkt von Glas“ auch hinsichtlich seiner Nachteile wohlbekannt.

[0072] Die Analyse des Housekeeping-Gens Elongation-Factor-1-alpha (EF1 α) belegt, dass beim direkten Katapultieren der Probe vom Glas 35.5 bis 40 PCR-Zyklen ([Fig. 5](#), dunkel schraffiert) erforderlich sind, um die gleiche Signalstärke zu erreichen wie mit 26.1–28.2 Zyklen, wenn das Katapultieren durch eine zusätzliche PEN-Schicht ([Fig. 5](#), hell schraffiert) vor der Probe unterstützt wird. Damit ist die Ausbeute an verwertbarem RNA-Material für eine qRT-PCR Analyse beim Katapultieren direkt vom Glas um etwa einen Faktor 100–1000 geringer als mit der PEN-Folien-Technik.

[0073] [Fig. 6](#) zeigt den Vergleich des erfindungsgemäßen Verfahrens (dunkel schraffiert) mit der PEN-Folien-Technik (hell schraffiert) für drei verschiedene Housekeeping-Gene, nämlich Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT), und Metastatic Lymph Node 51 (MLN51). Der erfindungsgemäße erfolgt durch Abrastern von direkt auf einem Objektträger liegenden histologischen Gefrierschnitten aus Lebergewebe. Laserpulse mit 355 nm Wellenlänge, ca. 1 ns Pulsdauer und etwa 8 μ J Energie wurden durch ein 10 \times Objektiv (NA = 0.15) etwa 10–20 μ m unter die Glasoberfläche des Objektträgers fokussiert. Der laterale Abstand der Laserexpositionen beim Abrastern beträgt 28 μ m. Bei diesem Abstand wird alles Probenmaterial im abgerasterten Bereich vom Objektträger entfernt.

[0074] Es ist anhand von [Fig. 6](#) kein Nachteil des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber der teureren und aufwendigeren PEN-Folien-Technik auszumachen.

Patentansprüche

1. Verfahren zum laser-induzierten Transport eines Materials in ein Auffanggefäß mittels gepulstem Laserlicht, wobei das Material auf einer ausgedehnten Flachseite eines für das Laserlicht transparenten Substrats angeordnet ist und das Laserlicht von einer dem Material abgewandten Seite des Substrats her in das Substrat eingestrahlt wird, mit den Schritten:

- Fokussieren des gepulsten Laserlichts in das Innere des Substrats derart, dass der Laserfokus einen vorbestimmten Abstand zur mit Material beladenen Flachseite des Substrats aufweist,
- Erzeugen eines Plasmas im Laserfokus durch nicht-lineare Absorption des Laserlichts, und
- Herauslösen und Beschleunigen des dem Laserfokus nächstgelegenen Materialteils in Richtung auf das Auffanggefäß durch den Impulsübertrag einer vom Laserfokus ausgehenden, den vorbestimmten Abstand zur mit Material beladenen Flachseite des Substrats durchlaufenden Stoßwelle, wobei der vorbestimmte Abstand zwischen Laserfokus und Material wenigstens 3 μ m beträgt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat aus einem Glas besteht.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das zu transportierende Material ein biologisches Material ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das biologische Material eine Zellkultur oder ein histologischer Schnitt ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass für das gepulste Laserlicht eine Wellenlänge oberhalb des Ultraviolett-Spektralbereichs verwendet wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass eine Wellenlänge aus dem nahen Infrarot-Spektralbereich verwendet wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass für das gepulste Laserlicht eine Pulsdauer zwischen 1 Pikosekunde und 100 Nanosekunden verwendet wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass ein Mikrochiplaser mit einer Pulsdauer zwischen 300 ps und 3 ns verwendet wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass gepulstes Laserlicht mit einer Beugungsmaßzahl $M^2 \leq 1,3$ verwendet wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass Laserpulsenergien zwischen 0.3 und 100 μ J verwendet werden.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass ein Sollradius für das herausgelöste und beschleunigte Materialteil festgelegt wird und dass der vorbestimmte Abstand des Laserfokus zur mit Material beladenen Substratoberfläche größer als dieser Sollradius ist.

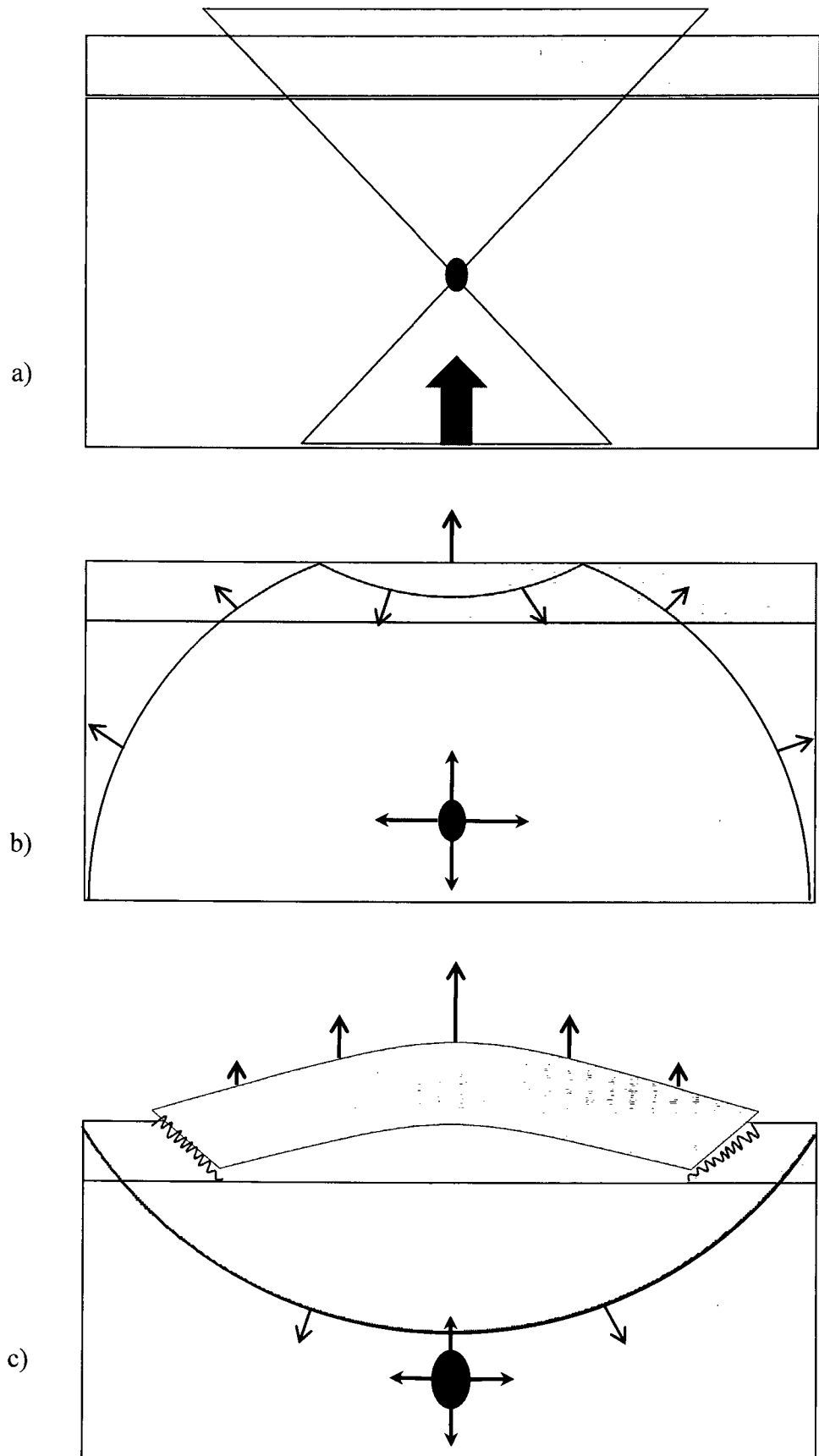
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Fokussierung des gepulsten Laserlichts mittels eines Objektivs mit einer numerischen Apertur zwischen 0,2 und 1,3 durchgeführt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass Fragmente des Substrats aus dem Substrat herausgelöst und in Richtung auf das Auffanggefäß beschleunigt werden.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, gekennzeichnet durch fortgesetztes Verschieben des Laserfokus unter Beibehaltung seines Abstandes zur mit Material beladenen Seite des Substrats, wobei die Verschiebung schrittweise zwischen den Einzelpulsen des gepulsten Laserlichts erfolgt und die Schrittweite der Verschiebung kleiner als der doppelte Abstand des Laserfokus zur mit Material beladenen Seite des Substrats ist.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



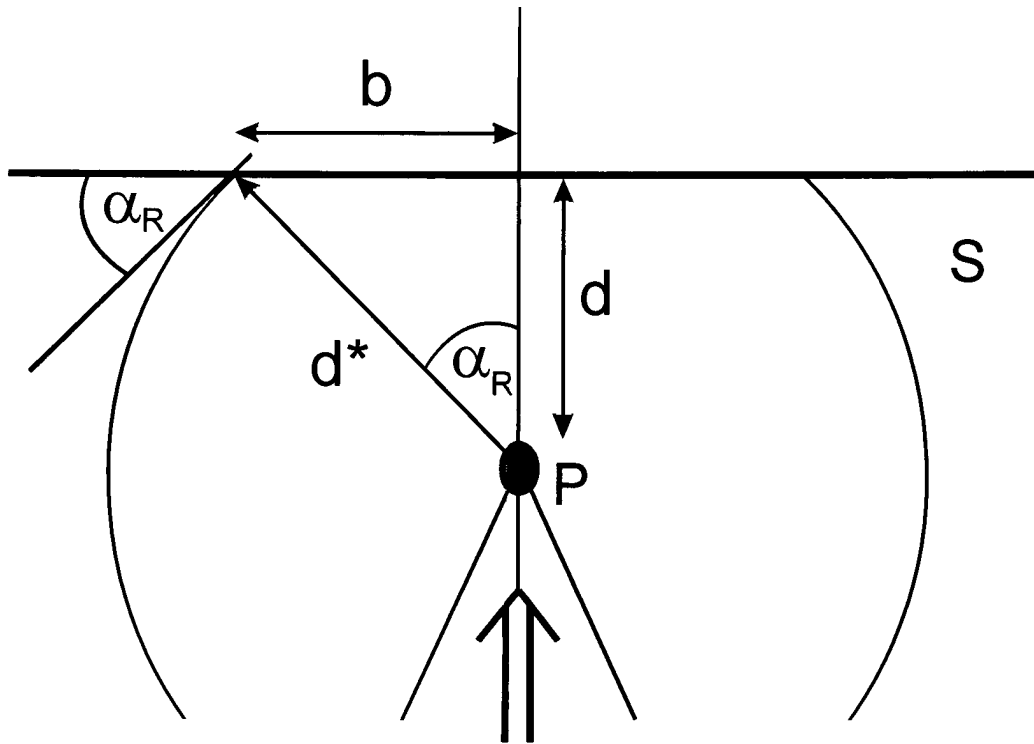


FIG. 2

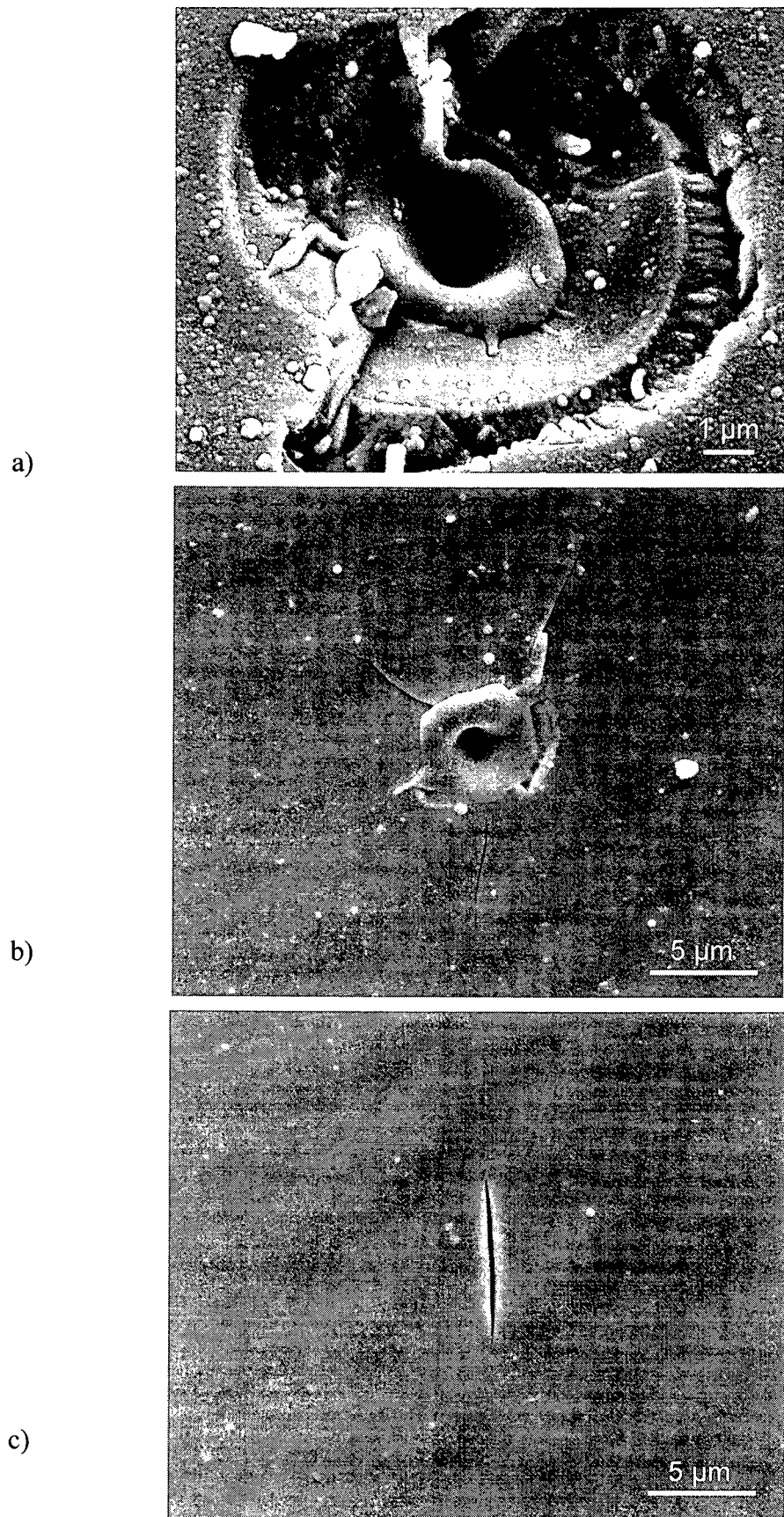


FIG. 3

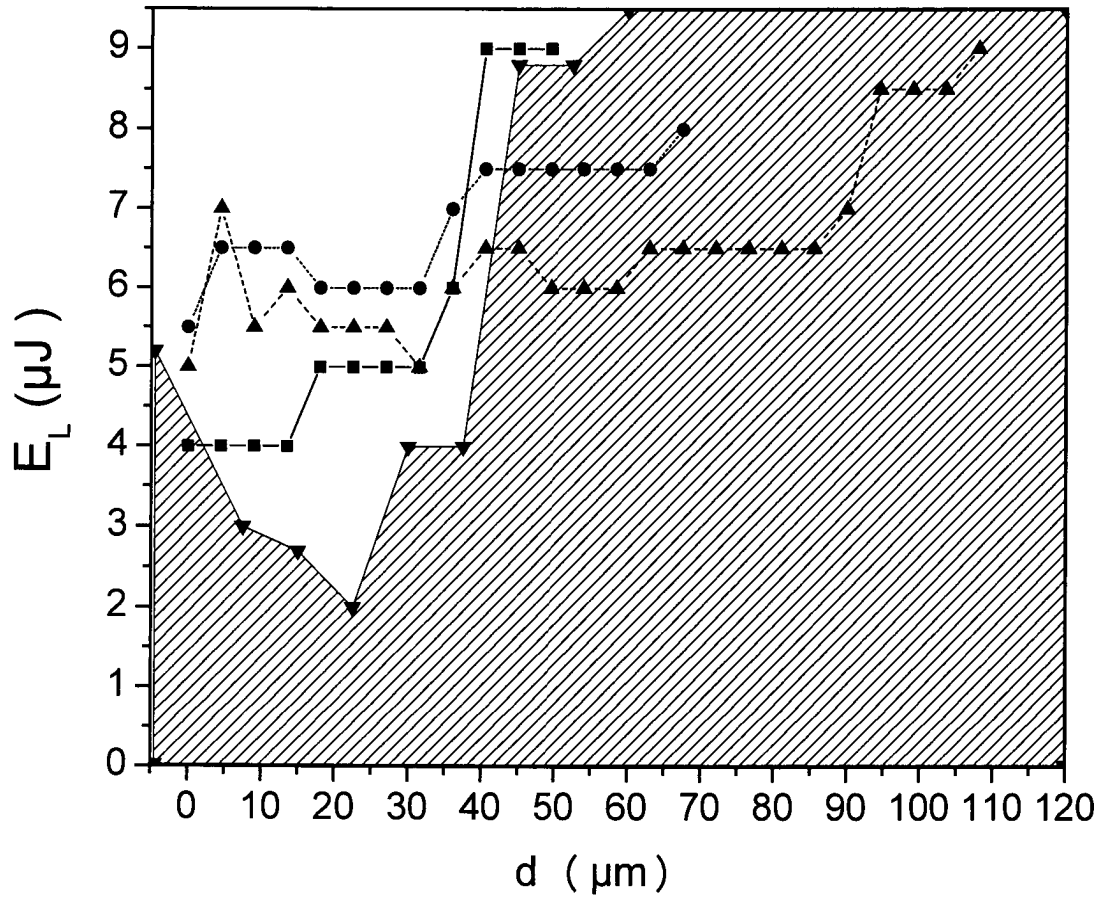


FIG. 4

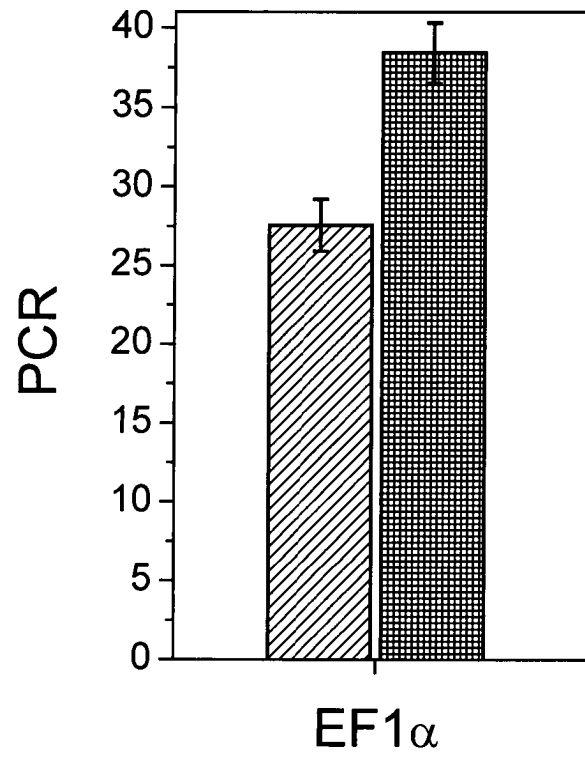


FIG. 5

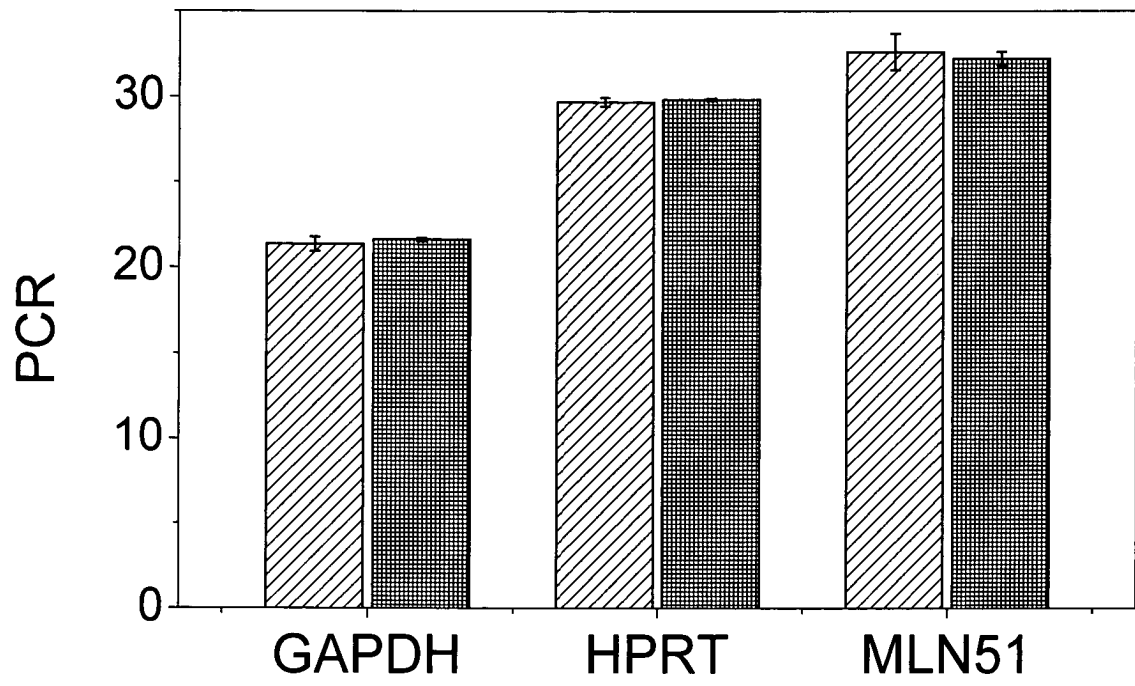


FIG. 6