

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Anwendungen neuer diodenlaserkompatibler Fluoreszenzmarker in der Bioanalytik

Peter Czerney¹, Frank Lehmann¹, Matthias Wenzel¹, Michael Seidel², Günter Gauglitz²

¹ Dyomics GmbH, Winzerlaer Str. 2A, 07745 Jena,

Tel. 03641-508200, f.lehmann@dyomics.com, www.dyomics.com

² Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 8, 72076 Tübingen

Registriernummer der Online-Anmeldung: 211

Poster

Fluoreszenzmarker werden bereits heute in der Bioanalytik und medizinischen Diagnostik in vielfältiger Weise eingesetzt. So basiert beispielsweise die Detektion in der Flow-Cytometrie ausschließlich auf laserinduzierter Fluoreszenz. Im Bereich der Hochdurchsatz-Analytik im Mikrotiterplattenformat und auf modernen DNA- bzw. Protein-Chips sind Fluoreszenzmarker nahezu ubiquitär einsetzbar.

Die an solche Marker vom Anwender gestellten Anforderungen sind vielfältig und reichen von hoher Quantenausbeute und photochemischer Stabilität über spezifische Reaktivität zu Biomolekülen bis zu Eigenschaften wie kontrollierbarem Stokes-Shift und Umgebungssensitivität des Fluorophors.

Als Anregungslichtquellen für Fluoreszenzmarker und ihrer Biokonjugate kommen gegenwärtig immer öfter Diodenlaser zum Einsatz, die mehrere Vorteile gegenüber alternativen Lichtquellen aufweisen. Diodenlaser sind preiswert und liefern bei geringer Leistungsaufnahme eine monochromatische und intensive Emission im Bereich oberhalb von 630 nm, also im roten und nahen infraroten (NIR-) Spektralbereich. Dort sind sowohl Autofluoreszenz von biologischem Material als auch Lichtstreuung gegenüber kürzeren Wellenlängen stark reduziert. So ist ein sehr gutes Signal/Rausch-Verhältnis erreichbar, das die Detektion immer geringer werdender Mengen von nachzuweisenden Analyten ermöglicht.

Die von uns entwickelten und vorgestellten Fluoreszenzmarker sind für die Anregung mit dem He/Ne-Laser (633 nm) und Diodenlasern optimiert. Durch die Verwendung von bisher nicht bei Fluoreszenzlabeln bekannten terminalen Heterocyclen aus der Gruppe der Benzopyrane sind Farbstoffe zugänglich, die mit ihrem Absorptionsmaximum exakt die Emission der erwähnten Laser matchen. Die Chromophore sind mit den in der Bioanalytik üblichen reaktiven Gruppen wie NHS-Estern, Maleimiden und Phosphoramiditen modifizierbar.

Insbesondere unsere NHS-Ester zeichnen sich durch eine hohe Kopplungseffizienz aus, so daß bei Biomolekülen mit mehreren Bindestellen wie Proteinen ein gut reproduzierbares Farbstoff / Protein (D/P) Verhältnis einstellbar ist.

Protein-Konjugate der Marker DY-630 und DY-635 weisen Quantenausbeute von bis zu 40% und Emissionsmaxima zwischen 660 und 670 nm auf. Bei hohen D/P-Verhältnissen kann die Quantenausbeute in gepufferter wäßriger Lösung durch Selbstlöschung drastisch sinken. Im Trockenen, beispielsweise auf DNA-Chips und auf Objektträgern für die FisH-Mikroskopie ist dieser Effekt jedoch wieder aufgehoben, und ein erhöhtes D/P-Verhältnis bringt so eine erhöhtes Fluoreszenzsignal mit sich. Am Beispiel von FisH-Mikroskop-Aufnahmen unter Verwendung von hochmarkierten DY-630-Avidin-Konjugaten und biotinylierten DNA-Sonden wird dieses Verhalten gut demonstriert.

Auch die freien Farbstoffe mit einer Quantenausbeute von ca. 5% in Lösung weisen im Festkörper ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal auf.

Am Beispiel eines homogenen Fluoreszenz-Bioassays im Mikrotiterplattenformat kann die Eignung des Markers DY-630 für das Hochdurchsatz-Screening demonstriert werden. In FRET (*Fluoreszenz Resonanter Energieübertragung*)-Experimenten wird gezeigt, daß das Label DY-630, gekoppelt an einen Antikörper, als Donor für ein CyTM5.5-markiertes Antigen dienen kann. Es wurden Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht. Zum Nachweis der Affinitätsbindung eignet sich der Anstieg der Akzeptor-Fluoreszenz, wenn die Bindungspartner nahe genug beieinander sind und ein strahlungsloser Energieübertragung erfolgen kann. Im Bioassay steigt das Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit zur Konzentration an Protein in Lösung an. Der Bioassay kommt ohne Waschschriffe aus und ist deshalb für eine parallele Detektion im Mikrotiterplattenformat geeignet. Im Fluoreszenz-Bioassay sind die Proteine im nanomolaren Bereich nachweisbar.

Die Variation des D/P-Verhältnisses beeinflußt auch bei Fluorescence Correlation Spectroscopy-Messungen die gezählten Counts pro Molekül. Dies kann ebenfalls am Beispiel von Avidin-Konjugaten und dem Vergleich zum freien Farbstoff gezeigt werden.

Der als Phosphoramidit aktivierte Fluoreszenzmarker DY-780-P eignet sich zur Markierung von synthetischen Oligonucleotiden (zur Verwendung als Primer in der PCR) während deren Festphasensynthese. Unter für die Oligosynthese typischen Bedingungen (Acetonitril als Lösungsmittel, Abspaltung mit konzentriertem Ammoniak) ist das Chromophor von DY-780 stabil. Die Detektion von mit DY-780-markierten PCR-Produkten ist durch Anregung mittels Diodenlaser (780 nm) auf gängigen Readersystemen möglich.

Literatur

- [1] Gwynne, P. and Page, G. (2000) *Science* **288**, 1081-1091.
- [2] Czerney, P., Lehmann, F., Wenzel, M., Buschmann, V. Dietrich, A., and Mohr G.J. (2001) *Biol. Chem.*, accepted.
- [3] Imazaka, T. *Talanta* **48**, 305-20