

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM TÜBINGEN 2001

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

Neuer langwelliger Fluoreszenzfarbstoff zur biomolekularen Erkennung von Protein-Protein-Wechselwirkungen über den Förster Energie-Transfer

M. Seidel, D. M. Villard, G. Gauglitz

Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Tübingen

Tel. 07071-2973048

michael.seidel@ipc.uni-tuebingen.de <http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de>

Registriernummer der Online-Anmeldung: 175

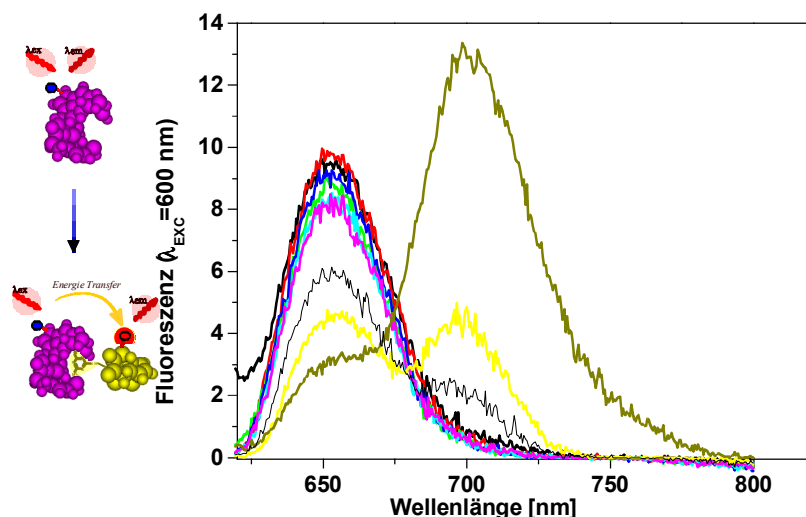
Poster

Fluoreszenz-Bioassays dienen dem sensitiven Nachweis biomolekularer Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand, Antikörper und Antigen oder DNA und DNA. Für den Nachweis der spezifischen Bindung von einem Protein an ein anderes eignet sich der Fluoreszenz Resonante Energie Transfer (FRET). Der Energietransfer erfolgt zwischen zwei fluorophoren Gruppen, die an das jeweilige Protein gekoppelt sind, wenn eine biomolekulare Erkennung erfolgt. Der FRET ist stark abstandsabhängig (1-10 nm) und hängt nicht wie andere homogene Nachweisverfahren (die *Fluoreszenz Korrelations-spektroskopie* oder die *Fluoreszenz Anisotropie*) vom Unterschied des Molekulargewichts ab.

Das FRET-Nachweisverfahren beruht auf der Grundlage der Förster-Theorie, die einen strahlungslosen Energieübertrag eines fluoreszierenden Donor-Moleküls auf ein Akzeptor-Molekül durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen voraussagt, wenn beide Chromophore nur wenige Nanometer entfernt sind. Als eine weitere Bedingung für den Energieübertrag ist der optimale Überlapp zwischen dem Fluoreszenzspektrum des Donor-Farbstoffes und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors.

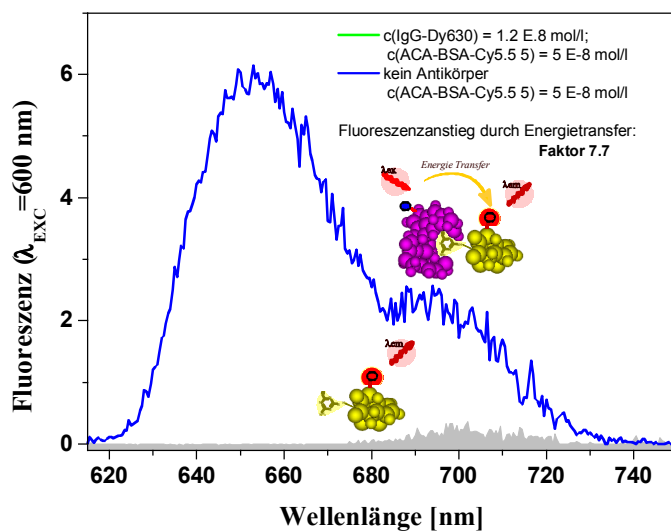
Der Donor wird im FRET-Nachweisverfahren zum Fluoreszieren angeregt. Abhängig von der Konzentration an akzeptormarkiertem Bindungspartner sinkt die Fluoreszenz des Donors und gleichzeitig steigt die Fluoreszenz des Akzeptors (Abb. 1).

Abb. 1: Fluoreszenzlöschung von Dy630 in Abhängigkeit der Konzentration an Cy5.5 markiertem Protein



Nahe Infrarot-Fluoreszenzfarbstoffe eignen sich sehr gut als Proteinmarker. Sie sind über billige Laserdioden im langwelligen Bereich (633nm) anregbar, deren geringe Energie die Proteine vor photochemischen Reaktionen schützt. Ein weiterer Vorteil dieser Farbstoffe ist die geringe Hintergrundfluoreszenz im Bereich der Detektionswellenlänge (>600 nm). Hauptsächlich wird dies durch die Fluoreszenz von Biomolekülen und Lichtstreuung im Bereich von 400-600 nm hervorgerufen.

Bisher wurden im homogenen FRET-Assay die Cyanin-Farbstoffe Cy5 und Cy5.5 als Förster Paar eingesetzt. Als neuer Donor-Farbstoff wurde in dieser Arbeit der neue langwellige Fluoreszenzfarbstoff



Dy630 der Firma Dyomics (Jena) verwendet. Das Fluoreszenzspektrum ist im Vergleich zu Cy5 ($\lambda_{em} = 670 \text{ nm}$) um 20 nm zum kurzwelligen Bereich verschoben. Aus diesem Grund sind die Fluoreszenzspektren von Donor- und Akzeptorfarbstoff besser voneinander getrennt, so dass sowohl das Quenchen des Donorfarbstoffes als auch der Fluoreszenzanstieg des Akzeptors auswertbar sind (Abbildung 2).

Abb. 2: Fluoreszenzanstieg durch Energietransfer im Vergleich zur direkten Anregung von Cy5.5 bei 600 nm

Der Fluoreszenzfarbstoff Dy630 lag als Aktivester vor und konnte direkt zum Markieren von Proteine über die Aminogruppen verwendet werden. Das fluoreszenzmarkierte Protein wurde charakterisiert. Es wurden die spektroskopische Parameter (Extinktionskoeffizient, maximale Anregungswellenlänge und maximale Emissionswellenlänge), Fluoreszenzquantenausbeute und der optimale Markierungsgrad an Protein bestimmt. Zudem wurde der Einsatz als Donor-Fluorophor in einem homogenen Fluoreszenz-Bioassay untersucht. Dazu wurde der Förster-Radius ermittelt, der den molekulareren Abstand des Förster-Paars bei halbmaximaler Effektivität des Energieübertrags definiert.

Zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkung eignet sich der Anstieg der Akzeptor-Fluoreszenz, wenn die Bindungspartner nahe genug beieinander sind und ein strahlungsloser Energietransfer erfolgen kann. Das Erkennungsprotein ist mit dem Donorfarbstoff Dy630 markiert, das zu untersuchende Proteine mit dem Akzeptorfarbstoff Cy5.5. Das Fluoreszenzsignal steigt in Abhängigkeit zur Konzentration an Protein in Lösung an. Der Bioassay kommt ohne Waschschrte aus und ist deshalb für eine parallele Detektion im Mikrotiterplattenformat geeignet. Im Fluoreszenz-Bioassay sind die Proteine im nanomolaren Bereich nachweisbar.

Literatur

- 1) New Donor-Acceptor Pair for Fluorescent Immunoassays by Energy Transfer. U. Schobel, H.-J. Egelhaaf, A. Brecht, D. Oelkrug, G. Gauglitz, *Bioconjugate Chem.* **10**, 1107-1114 (1999).
- 2) Resonant Energy Transfer Detection for Low Volume Immunoassay in Environmental Applications. A. Brecht, U. Schobel, G. Gauglitz, in 'Biosensors for Environmental Diagnostics', Hock, Barcelo, Cammann, Hansen, Turner (Eds.), In Teubner-Reihe 'Umwelt', Teubner Verlag, Stuttgart 1998, pp. 11-27.
- 3) G. Gauglitz: Optical Sensor Arrays Based on Microtiterplate Dimension. *Mikrochim. Acta* **131**, 9-17 (1999).
- 4) G. Gauglitz: Optical detection methods for combinatorial libraries. *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**, 351-355 (2000).