

ATTO 565 und ATTO 590

Allgemeine Informationen

ATTO 565 und ATTO 590 sind Fluoreszenzmarker aus der Familie der Rhodamin-Farbstoffe. Diese Farbstoffe besitzen als gemeinsames Strukturelement einen Carboxyphenyl-Substituenten am zentralen Kohlenstoffatom eines Xanthen-Grundkörpers.

Die Carboxyl-Gruppe (rot) befindet sich in der 2- oder ortho-Position und beeinflusst maßgeblich die physikalisch-chemischen Eigenschaften aller Rhodamine [1].

Durch die freie ortho-Carboxyl-Gruppe haben auch ATTO 565 und ATTO 590 sowie alle Derivate besondere Eigenschaften, die beim Umgang mit diesen Farbstoffen zu beachten sind. Für die Verwendung als Fluoreszenzmarker besitzen ATTO 565 und ATTO 590 noch eine zusätzliche Carboxyl-Gruppe in der 4- oder 5-Position des Phenyl-Substituenten:

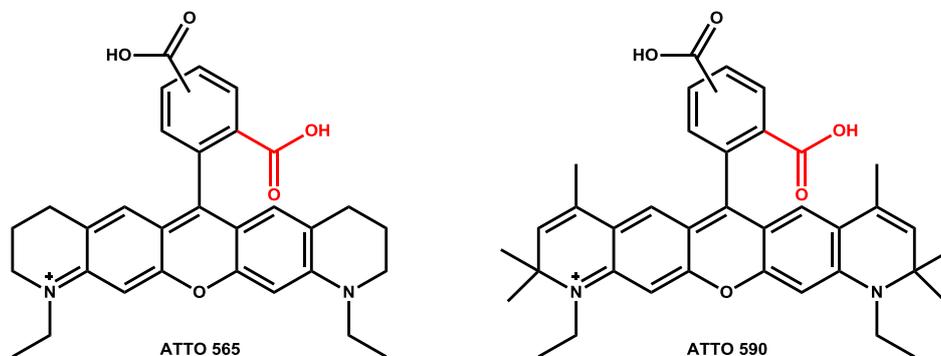


Abb. 1: Strukturen von ATTO 565 und ATTO 590.

Abhängigkeit der Absorptionswellenlänge vom pH-Wert

Das Protonierungs-Deprotonierungs-Gleichgewicht der ortho-Carboxyl-Gruppe beeinflusst die optischen Eigenschaften der Rhodamine durch die Nähe zum Chromophor sehr stark.

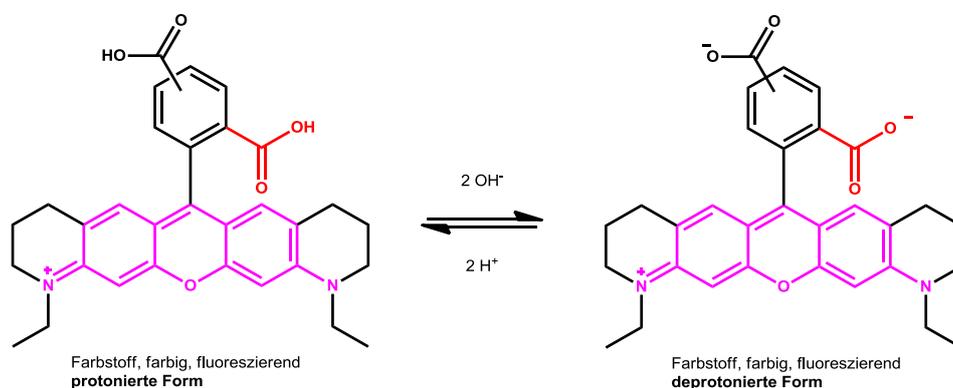


Abb. 2: Protonierungs-Deprotonierungs-Gleichgewicht am Beispiel von ATTO 565 (z.B. in Ethanol).

[1] K. H. Drexhage, Structure and Properties of Laser Dyes, in: F. P. Schäfer, Dye Lasers, 1973, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

So ist die Lage des Absorptionsmaximums der Farbstoffe ATTO 565 und ATTO 590 für die protonierte und deprotonierte Farbstoffform verschieden. Beispielsweise verschiebt sich das Absorptionsmaximum von ATTO 565 in Ethanol durch Deprotonierung beider Carboxylgruppen relativ zur protonierten Form um 16 nm zu kürzeren Wellen (hypsochrom).

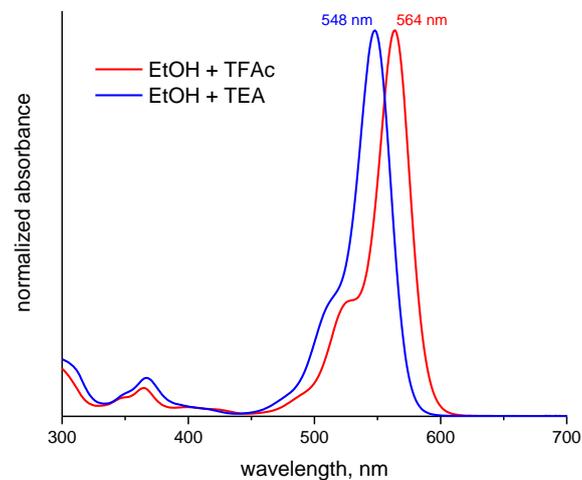


Abb. 3: Vergleich der Lage des Absorptionsmaximums von ATTO 565 in Ethanol mit Trifluoressigsäure (TFAc) und in Ethanol mit Triethylamin (TEA).

Farbstoff-Spirolacton-Gleichgewicht

Im Gleichgewicht können ATTO 565 und ATTO 590 in der deprotonierten Form aber auch ein farbloses Spirolacton bilden: Beim nukleophilen Angriff des Carboxylat-Anions am zentralen Kohlenstoff entsteht ein Fünfring und das chromophore System des Farbstoffs wird unterbrochen, so dass die sich bildende Verbindung im Sichtbaren nicht mehr absorbiert und fluoresziert (Abb. 4).

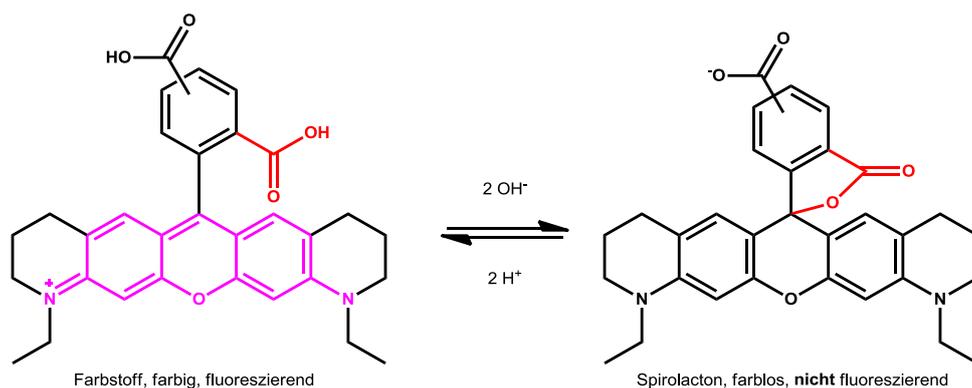


Abb. 4: Farbstoff-Spirolacton-Gleichgewicht am Beispiel von ATTO 565 (z.B. in Aceton).

Der Anteil an Spirolacton bzw. die Lage dieses Gleichgewichts ist stark abhängig vom Lösungsmittel, vom pH-Wert, von der Temperatur und der Farbstoffstruktur. Das Gleichgewicht liegt in polaren, aprotischen Lösungsmitteln fast vollständig auf der Seite des Spirolactons. In wasserfreiem Aceton sind Lösungen der Farbstoffe ATTO 565 und ATTO 590 deshalb nahezu farblos.

Auch in DMSO oder DMF ist eine Spirolacton-Bildung möglich. Dies ist insbesondere in Gegenwart von Base der Fall (Abb. 5). Handelsübliches DMSO enthält – unabhängig von den Reinheitsangaben der Hersteller – unterschiedlich hohe Anteile basischer Verunreinigungen, die die Lage des Farbstoff-Spirolacton-Gleichgewichtes beeinflussen können.

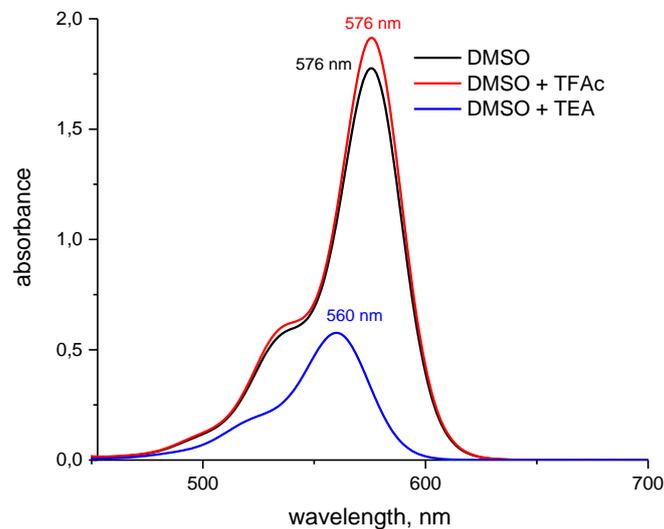


Abb. 5: Absorptionsspektren von ATTO 565 in DMSO, in DMSO mit Trifluoressigsäure (TFAc) und in DMSO mit Triethylamin (TEA).

In polaren, protischen Lösungsmitteln wie Wasser oder Ethanol liegt das Gleichgewicht – wie oben beschrieben – hingegen fast vollständig auf der Seite der farbigen Form.

Aggregation von Farbstoffen / Intermolekulare Wechselwirkung

In wässriger Lösung zeigen viele organische Farbstoffe bei höherer Konzentration das Phänomen der Aggregation. Dieses Verhalten ist stark von der Struktur des Farbstoffes und seiner Hydrophilie abhängig. Allgemein gilt, dass hydrophobe Farbstoffe (z.B. ATTO 520) in wässriger Lösung stärker zur Aggregation neigen als hydrophile Farbstoffe (z.B. ATTO 532). Durch die *intermolekulare* Wechselwirkung der einzelnen Farbstoffmoleküle verändert sich die Absorption einer solchen Farbstofflösung stark. Im Absorptionsspektrum wird eine zu kürzeren Wellen verschobene, so genannte „Dimerenbande“ beobachtet.

Die gemessene Absorption solcher Lösungen ist die Überlagerung der Absorptionen von Monomeren, Dimeren und eventuell höheren Aggregaten. Dies ist bei der Konzentrationsbestimmung von Farbstofflösungen in wässrigem Medium stets zu bedenken.

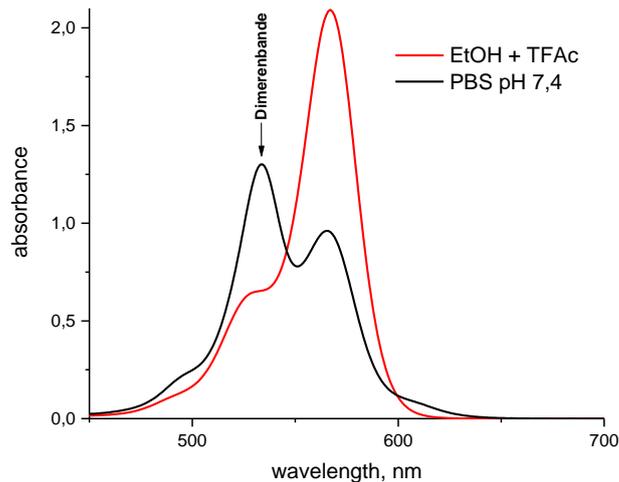


Abb. 6: Absorptionsspektren einer Lösung von ATTO 565 gleicher Konzentration in PBS-Puffer (pH 7,4) und in Ethanol mit Trifluoressigsäure (TFAc).

Die Bildung eines Dimers aus zwei Monomeren ist eine Gleichgewichtsreaktion, die stark von der Konzentration des Farbstoffs und der Temperatur der Lösung abhängig ist. Somit lassen sich die Dimere durch Verdünnen der Lösung wieder in Monomere überführen. Das „Monomerenspektrum“ ist dann erreicht, wenn sich das gemessene Absorptionsspektrum bei weiterer Verdünnung und entsprechender Erhöhung der Schichtdicke nicht mehr ändert. Für die meisten hydrophoben Farbstoffe ist dies wie für ATTO 565 und ATTO 590 bei einem Extinktionswert von ca. 0,04 (Schichtdicke 1 cm; $c = 10^{-7} - 10^{-6}$ mol/l) gegeben.

Da die Farbstoff-Dimere nicht fluoreszieren, wird durch die Aggregation auch die Fluoreszenz der Farbstofflösung beeinflusst.

Intramolekulare Wechselwirkung in Proteinkonjugaten / DOL-Bestimmung

Bei der Reaktion eines Farbstoff-NHS-Esters mit den Aminogruppen eines Proteins werden Farbstoffkonjugate gebildet, in denen die gebundenen Farbstoffmoleküle ebenfalls miteinander in Wechselwirkung treten können. Dies äußert sich in gleicher Weise durch eine starke Veränderung des Absorptionsspektrums. In Abb. 7 wird dies am Beispiel des ATTO 565-Streptavidinkonjugates gezeigt. Man beobachtet eine zusätzliche, kurzweilige Absorptionsbande analog zur „Dimerenbande“ einer wässrigen Farbstofflösung mit hinreichend hoher Konzentration. Da es sich in diesem Fall aber um *intramolekulare* Wechselwirkungen der kovalent gebundenen Farbstoffmoleküle handelt, ändert sich das Absorptionsspektrum durch Verdünnen der Konjugatlösung nicht.

Die Bestimmung des Farbstoff-Protein-Verhältnisses (degree of labeling, DOL) durch Verwendung der Extinktion am Maximum der langwelligen Absorptionsbande eines Konjugats ist in solchen Fällen mit einem großen Fehler behaftet, da die gemessene Extinktion dort dann zu gering ausfällt. Dieser Fehler kann je nach Stärke der Wechselwirkung 20 % und mehr betragen!

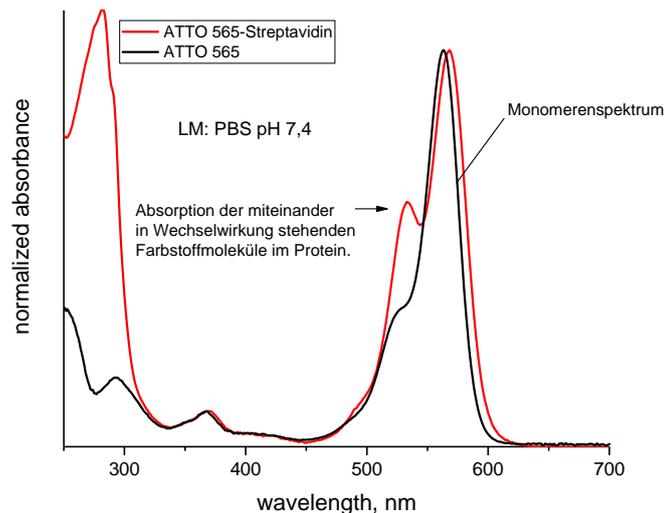


Abb. 7: Vergleich der Absorptionsspektren von ATTO 565-Streptavidin (DOL: 2,5) und ATTO 565 in PBS pH 7,4.

In diesen Fällen wird empfohlen, das DOL über die Stoffmenge des eingesetzten Farbstoffs und die Stoffmenge des ungekoppelten Farbstoffs zu bestimmen. Dafür ist es notwendig bei der Gelchromatographie auch die zweite farbige Zone zu sammeln. Die Stoffmenge des darin enthaltenen ungekoppelten Farbstoff wird dann mittels Extinktionsmessung und des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt. Auch hier ist aufgrund der Aggregationstendenz von ATTO 565 und ATTO 590 darauf zu achten, dass die Extinktion einen Wert von 0,04 (Schichtdicke 1 cm) nicht überschreitet. Gegebenenfalls muss die Lösung verdünnt werden. Über das Verhältnis der Stoffmenge des eingesetzten Farbstoffs und der Stoffmenge des ungekoppelten Farbstoffs lässt sich mit der Stoffmenge des verwendeten Proteins das DOL berechnen ohne auf die Extinktion des Farbstoffs im Konjugat zurückzugreifen.

Konzentrationsbestimmung von ATTO 565- und ATTO 590-Farbstofflösungen

Aufgrund der oben beschriebenen Besonderheiten der Farbstoffe ATTO 565 und ATTO 590 ist bei der Konzentrationsbestimmung einer Farbstofflösung mittels Extinktionsmessung stets darauf zu achten, dass sowohl die Bildung der Spirolactonform verhindert wird als auch der Farbstoff in einer definierten protonierten oder deprotonierten Form vorliegt.

Zur Konzentrationsbestimmung einer Farbstoffstammlösung (z.B. in DMSO, DMF, Acetonitril) wird daher empfohlen, ein Aliquot dieser Lösung für die Extinktionsmessung mit saurem Ethanol (0,1 Vol.-% Trifluoressigsäure) zu verdünnen.

Bei Messungen in wässrigem Medium sollte außerdem auf eine ausreichende Verdünnung geachtet werden, damit praktisch ausschließlich das Absorptionsspektrum der Monomere vorliegt.