

# Verwendung von lumineszierenden Ruthenium(II)-Komplexen zur Markierung von Antikörpern<sup>1</sup>

B. Ullrich, S. Seeger<sup>\*</sup>, J. Wolfrum

Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 253, D-69120 Heidelberg, Germany

Eingegangen 28 Januar 1997

## Abstract

Luminescent ruthenium(II) complexes are described for application as markers in multicomponent analysis in immunodiagnosics. The ruthenium compounds have very similar absorption and emission spectra, but can be distinguished by their luminescence lifetimes. Antibodies were labelled with the ruthenium compounds and the luminescence properties were measured. © 1997 Published by Elsevier Science S.A.

*Keywords:* Ruthenium(II) complexes; Luminescence; Time resolved spectroscopy; Fluorescence immunoassay

## 1. Einleitung

Die spektroskopischen Eigenschaften der lumineszierenden Verbindung Ruthenium(II)-Tris(2,2'-bipyridyl) und ähnlicher metallorganischer Komplexe bieten eine Reihe interessanter Anwendungen, wie z.B. der Einsatz als Sensibilisatoren bei der photolytischen Spaltung von Wasser [1], als Solarkollektoren in photovoltaischen Zellen [2] und als Lumineszenzsonden zur Messung von pH, Temperatur und Sauerstoffkonzentration in optischen Sensoren [3,4]. Aufgrund ihrer hohen Lumineszenzlebensdauern verglichen mit organischen Fluoreszenzfarbstoffen wie Fluorescein und Rhodaminen aber auch mit natürlichen Fluorophoren in Blut und Gewebe wurden sie als Marker in der Biodiagnostik vorgeschlagen [5–7]. Durch eine zum Anregungslicht zeitlich verschobene Detektion des Lumineszenzsignals können störende Untergrundfluoreszenz und Streulicht stark reduziert werden [8].

Der Einsatz von lumineszierenden Verbindungen in der Bioanalytik und medizinischen Diagnostik hat in den letzten Jahren aufgrund der einfachen Handhabung und der hohen Nachweisempfindlichkeiten bis hin zur

Einzelmoleküldetektion [9,10] beträchtlich zugenommen [11]. Die Verwendung verschiedener Lumineszenzmarker bietet prinzipiell die Möglichkeit, mehrere Substanzen simultan in einem Gemisch nachzuweisen. Es ist jedoch schwierig, mehr als drei oder vier Farbstoffe anhand ihrer Emissionsspektren zuzuordnen, da die Banden zunehmend überlappen. Eine Alternative stellt die Identifizierung über die Lumineszenzlebensdauern dar [12–15].

Die Empfindlichkeit dieser Methode und die Anzahl der unterscheidbaren Marker in einem Mehrkomponentensystem hängen stark vom Unterschied zwischen den Lebensdauern der einzelnen Farbstoffe ab [16]. Typische Fluoreszenzlebensdauern organischer Farbstoffe wie Cumarine, Fluorescein und Rhodamine liegen zwischen einer und fünf Nanosekunden. Nur wenige organische Verbindungen, z.B. Naphthalin, Acridin und Anthracen zeigen längere Abklingkurven. Pyrenderivate mit Lebensdauern von etwa hundert Nanosekunden in Wasser scheinen die obere Grenze zu bilden [17].

Längere Abklingzeiten findet man meist für Emissionsprozesse, die einen deutlichen Phosphoreszenzcharakter aufweisen. Während Phosphoreszenz in luftgesättigter wässriger Lösung normalerweise nicht beobachtet werden kann, da strahlungslose Übergänge verursacht durch Wechselwirkungen mit der Umgebung schneller ablaufen als der formal verbotene emittierende Übergang, zeigen Übergangsmetallkomplexe mit stark

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +0049-6221-548460; fax: +0049-6221-544255.

<sup>1</sup> Herrn Professor Dr. G. Huttner zum 60. Geburtstag gewidmet.

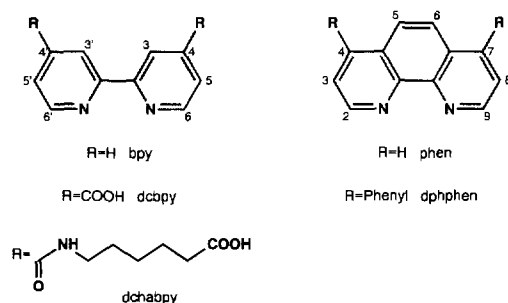


Abb. 1. Liganden.

koordinierenden Liganden Lumineszenzlebensdauern bis in den Mikrosekundenbereich [3,18]. Das schwere Zentralatom begünstigt Singulett–Triplet-Übergänge. Für einige Lanthanoidkomplexe, in denen durch einen Energietransfer von Liganden zum Zentralatom auf direktem Wege nicht erreichbare Zustände besetzt werden, findet man sogar Lebensdauern bis zu mehreren Millisekunden [12,17,19].

Hier sollen Rutheniumkomplexe als Marker vorgestellt werden, die aufgrund ihrer charakteristischen Lumineszenzlebensdauern identifiziert werden können. Verschiedene Rutheniumkomplexe mit drei 2,2'-Bipyridin- oder 1,10-Phenanthrolinliganden (Abb. 1), die unterschiedliche Lumineszenzlebensdauern in wässriger Lösung zeigen, wurden an Antikörper gekoppelt und die photophysikalischen Eigenschaften untersucht. In Immunoassays werden markierte Antikörper eingesetzt, die ein nachzuweisendes Antigen spezifisch erkennen und dieses durch Bildung eines Antigen–Antikörper-Komplexes sichtbar machen. Für den Nachweis in einem Mehrkomponentensystem ist es wichtig, daß die Lumineszenzabklingkurven der Konjugate unterscheidbar sind, so daß eine Identifizierung durch zeitaufgelöste Lumineszenzspektroskopie möglich ist.

## 2. Experimenteller Teil

### 2.1. Chemikalien

$RuCl_3 \cdot xH_2O$ ,  $Ru(bpy)_3Cl_2$ , 2,2'-Bipyridin (bpy), 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure (dcbpy), 1,10-Phenanthrolin (phen) und 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin (dphphen), N-Hydroxysuccinimid, 6-Aminohexansäure, die Aktivierungsreagenzien N-Ethyl-N'-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC), N,N,N',N'-Tetramethyl-(succinimido)-uronium-tetrafluoroborat (TSTU), O-(5-Norbornen-2,3-dicarboxyimido)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TNTU) und Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) sowie der polyklonale Antikörper Kaninchen Immunoglobulin G waren kommerziell erhältlich und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

### 2.2. Synthesen

2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure wurde nach [20] mit einem 1,1-fachen Überschuß EDC und N-Hydroxysuccinimid in den Bis(N-hydroxysuccinimidylester) überführt. Der Ester wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Laufmittel Dichlormethan mit steigendem Methanolgehalt) und anschließend mit zwei Äquivalenten 6-Aminohexansäure in Dimethylformamid zum Bis(6-carboxyhexylamid) umgesetzt.

Als Ausgangsverbindung für die Synthese der Ruthenium(II)-Komplexe diente  $RuCl_3 \cdot xH_2O$ . Die Synthesen erfolgten nach Literaturvorschriften für ähnliche Verbindungen [1,21,22]. Die Reinheit wurde durch Reversed-Phase HPLC kontrolliert. Die Verbindungen wurden durch  $^1H$  NMR-Spektren und UV/Vis-Absorptionsspektren charakterisiert.

#### 2.2.1. 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure-bis(N-hydroxysuccinimidylester)

$^1H$  NMR (200 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta = 2.58$  ppm (s, 8 H, 4  $\cdot$   $CH_2$ ), 8.12 ppm (dd,  $J = 5.0$  Hz, 1.6 Hz, 2 H, 5,5'-H), 8.93 ppm (s(br), 2 H, 3,3'-H), 9.09 ppm (d,  $J = 5.0$  Hz, 2 H, 6,6'-H).

#### 2.2.2. $[Ru(bpy)_2(dcbpy)]$

UV/Vis (PBS pH 7.4): 458 nm (br), 342 nm (br), 302 nm (sh), 287 nm, 244 nm.

$^1H$  NMR (300 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta = 7.49, 7.54$  ppm (2 dd, aa 2 t,  $J = 6.5$  Hz, 7.3 Hz, 2  $\cdot$  2 H, 2  $\cdot$  5,5'-H bpy), 7.71, 7.73 ppm (2 d,  $J = 6.5$  Hz, 2  $\cdot$  2 H, 2  $\cdot$  6,6'-H bpy), 7.83, 7.86 ppm (2 d, aa m,  $J = 5.8$  Hz, 5.8 Hz, 2  $\cdot$  2 H, 5,5',6,6'-H dcbpy), 8.16, 8.18 ppm (2 dd, aa 2 t,  $J = 7.7$  Hz, 7.3 Hz, 2  $\cdot$  2 H, 2  $\cdot$  4,4'-H bpy), 8.84 ppm (dd,  $J = 7.7$  Hz, 1.0 Hz, 4 H, 2  $\cdot$  3,3'-H bpy), 9.25 ppm (s, 2 H, 3,3'-H dcbpy).

#### 2.2.3. $[Ru(bpy)_2(dchabpy)]$

UV/Vis (PBS pH 7.4): 474 nm (br), 455 nm (br), 356 nm, 304 nm (sh), 286 nm, 246 nm.

$^1H$  NMR (300 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta = 1.29$ – $1.40$  ppm (m, 4 H, 2  $\cdot$   $\gamma$ - $CH_2$ ), 1.49– $1.69$  ppm (m, 8 H, 2  $\cdot$   $\beta$ - $CH_2$ , 2  $\cdot$   $\delta$ - $CH_2$ ), 2.19 ppm (t,  $J = 7.1$  Hz, 4 H, 2  $\cdot$   $\alpha$ - $CH_2$ ), 3.34 ppm (t,  $J = 6.1$  Hz, 4 H, 2  $\cdot$   $\epsilon$ - $CH_2$ ), 7.50, 7.55 ppm (2 dd, aa 2 t,  $J = 6.5$  Hz, 6.8 Hz, 2  $\cdot$  2 H, 2  $\cdot$  5,5'-H bpy), 7.71, 7.78 ppm (2 d,  $J = 5.5$  Hz, 5.3 Hz, 2  $\cdot$  2 H, 6,6'-H bpy), 7.87– $7.92$  ppm (2 d, aa m, 2  $\cdot$  2 H, 5,5',6,6'-H dchabpy), 8.12– $8.23$  ppm (2 dd, aa m,  $J = 7.9$  Hz, 7.9 Hz, 4 H, 2  $\cdot$  4,4'-H bpy), 8.87 ppm (d,  $J = 7.9$  Hz, 4 H, 2  $\cdot$  3,3'-H bpy), 9.57 ppm (s, 2 H, 3,3'-H dchabpy), 9.88 ppm (s, 2 H, NH,  $D_2O$ -austauschbar).

#### 2.2.4. $[Ru(phen)_2(dchabpy)]$

UV/Vis (PBS pH 7.4): 470 nm (br), 441 nm (br), 384 nm, 306 nm (sh), 291 nm, 262 nm.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ -Austausch):  $\delta = 1.18\text{--}1.39$  ppm (m, 4 H,  $2 \cdot \gamma\text{-CH}_2$ ),  $1.40\text{--}1.63$  ppm (m, 8 H,  $2 \cdot \beta\text{-CH}_2$ ,  $2 \cdot \delta\text{-CH}_2$ ),  $1.96$  ppm (t,  $J = 6.1$  Hz, 4 H,  $2 \cdot \alpha\text{-CH}_2$ ),  $3.30$  ppm (t,  $J = 6.8$  Hz, 4 H,  $2 \cdot \epsilon\text{-CH}_2$ , nach  $\text{D}_2\text{O}$ -Austausch sichtbar),  $7.71$  ppm (dd,  $J = 5.5$  Hz,  $8.1$  Hz, 2 H,  $2 \cdot 3\text{-H phen}$ ),  $7.75$  ppm (d,  $J = 6.2$  Hz, 2 H,  $2 \cdot 5,5'\text{-H dchabpy}$ ),  $7.83$  ppm (d,  $J = 5.9$  Hz, 2 H,  $6,6'\text{-H dchabpy}$ ),  $7.87\text{--}7.98$  ppm (dd, d, aa m, 4 H,  $2 \cdot 8\text{-H phen}$ ,  $2 \cdot 2\text{-H phen}$ ),  $8.28$  ppm (d,  $J = 5.0$  Hz, 2 H,  $2 \cdot 9\text{-H phen}$ ),  $8.36$ ,  $8.40$  ppm (2 dd, aa m,  $J = 9.0$  Hz,  $9.0$  Hz, 4 H,  $2 \cdot 5,6\text{-H phen}$ ),  $8.75$ ,  $8.84$  ppm (2 d,  $J = 8.1$  Hz,  $8.1$  Hz, 4 H,  $2 \cdot 4,7\text{-H phen}$ ),  $9.76$  ppm (s, 2 H,  $3,3'\text{-H dchabpy}$ , nach  $\text{D}_2\text{O}$ -Austausch),  $10.13$  ppm (s, 2 H,  $3,3'\text{-H dchabpy}$ ),  $10.42$  ppm (s, 2 H, NH,  $\text{D}_2\text{O}$ -austauschbar).

#### 2.2.5. $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{dchabpy})]$

UV/Vis (PBS pH 7.4): 466 nm (br), 343 nm (br), 302 nm, 246 nm.

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ ):  $\delta = 2.27\text{--}2.48$  ppm (m, 4 H,  $2 \cdot \gamma\text{-CH}_2$ ),  $2.49\text{--}2.78$  ppm (m, 8 H,  $2 \cdot \beta\text{-CH}_2$ ,  $2 \cdot \delta\text{-CH}_2$ ),  $3.36$  ppm (t,  $J = 7.2$  Hz, 4 H,  $2 \cdot \alpha\text{-CH}_2$ ),  $4.46$  ppm (t,  $J = 6.9$  Hz, 4 H,  $2 \cdot \epsilon\text{-CH}_2$ ),  $8.80$  ppm (d,  $J = 6.1$  Hz, 2 H,  $5,5'\text{-H dchabpy}$ ),  $8.87$  ppm (d,  $J = 6.1$  Hz, 2 H,  $6,6'\text{-H dchabpy}$ ),  $8.91\text{--}9.05$  ppm (m, 8 H,  $2 \cdot 5,5',6,6'\text{-H dcbpy}$ ),  $10.13$  ppm (s, 2 H,  $3,3'\text{-H dchabpy}$ ),  $10.18$  ppm (s, 4 H,  $2 \cdot 3,3'\text{-H dcbpy}$ ).

#### 2.2.6. $[\text{Ru}(\text{dphphen})_2(\text{dchabpy})]$

UV/Vis (PBS pH 7.4): 466 nm (br), 400 nm (br), 299 nm (sh), 279 nm.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 1.27\text{--}1.44$  ppm (m, 4 H,  $2 \cdot \gamma\text{-CH}_2$ ),  $1.46\text{--}1.70$  ppm (m, 8 H,  $2 \cdot \beta\text{-CH}_2$ ,  $2 \cdot \delta\text{-CH}_2$ ),  $2.17$  ppm (t,  $J = 6.1$  Hz, 4 H,  $2 \cdot \alpha\text{-CH}_2$ ),  $3.34$  ppm (t, 4 H,  $2 \cdot \epsilon\text{-CH}_2$ , von  $\text{H}_2\text{O}$ -Signal verdeckt),  $7.52\text{--}7.92$  ppm (m, 32 H, 20 Phenyl-H dphphen,  $2 \cdot 2,3,8,9\text{-H dphphen}$ ,  $5,5',6,6'\text{-H dcbpy}$ ),  $8.26$  ppm (s, 4 H,  $2 \cdot 5,6\text{-H phen}$ ),  $10.03$  ppm (s, 2 H,  $3,3'\text{-H dchabpy}$ ),  $10.06$  ppm (s, 2 H, NH).

#### 2.3. Markierung von Antikörpern mit Rutheniumkomplexen

Die Aktivierung der Carboxylfunktionen der Rutheniumkomplexe erfolgte nach der Methode von Bannwarth [5]. Ca.  $1 \mu\text{mol}$  des entsprechenden Rutheniumkomplexes wurde in  $20 \mu\text{l}$  wasserfreiem N,N-Dimethylformamid gelöst und mit je  $2.1 \mu\text{mol}$  des Aktivierungsreagenzes TSTU und Diisopropylethylamin ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Aktivierung zum Succinimidylester konnte durch Reversed-Phase HPLC kontrolliert werden.

$80 \text{ nmol}$  des aktivierten Farbstoffs in N,N-Dimethylformamid wurden mit einem Boratpuffer pH 8.2 auf  $50 \mu\text{l}$  aufgefüllt und in kleinen Portionen zu einer Lösung von  $4 \text{ nmol}$  Antikörper in  $200 \mu\text{l}$  Boratpuffer

pH 8.2 gegeben. Nach 1.5 Stunden wurde das Reaktionsgemisch durch Gelfiltration an Sephadex G25 aufgetrennt. Zur Elution wurde eine  $0.1 \text{ M}$  Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) pH 7.4 verwendet.

Die photophysikalischen Eigenschaften wurden in PBS pH 7.4 bei  $21^\circ\text{C}$  untersucht. Die Konzentration der Rutheniumverbindung lag bei  $10^{-5} \text{ M}$ . Die in reinem Wasser kaum lösliche Verbindung  $[\text{Ru}(\text{dphphen})_2(\text{dchabpy})]$  wurde in einer ein Prozent ethanolhaltigen wäßrigen Lösung untersucht. Die Lumineszenzlebensdauern wurden mit einem Spektrometer LS 100 der Firma Photon Technology International (PTI) nach der Methode des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens gemessen. Die Proben wurden mit einer mit Wasserstoff gefüllten Blitzlampe mit einem Puls von  $2.0 \text{ ns}$  FWHM bei  $460 \text{ nm}$  angeregt. Die Emission wurde im Maximum detektiert. Die Auswertung erfolgte mit der zum Meßsystem gehörigen Software. Die Abklingkurven ließen sich an mono- oder biexponentielle Zerfallsfunktionen anpassen, wobei die Abweichung von den Meßpunkten ausgedrückt durch  $\chi^2$  in allen Fällen unter 1.2 lag. Die Aufnahme der Emissionsspektren erfolgte mit dem gleichen Gerät, jedoch diente eine Xenonlampe zur Anregung. Die relativen Lumineszenzintensitäten wurden auf Ruthenium(II)-Tris(bipyridyl)dichlorid bezogen, dessen Quantenausbeute in der Literatur in luftgesättigter wäßriger Lösung mit 2.8% angegeben wird. Als Maß für die Intensität diente das Integral über die Emissionsbande normiert auf die optische Dichte der Proben bei der Anregungswellenlänge.

Zur Untersuchung des Einflusses des anionischen Detergenzes Natriumdodekylsulfat wurde so viel einer fünfprozentigen Lösung zur Farbstofflösung in PBS gegeben, daß die kritische Micellenkonzentration von  $8.1 \text{ mM}$  [23] erreicht war.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Rutheniumkomplexe mit verschiedenen Lumineszenzlebensdauern sollten über die Carboxylgruppen des Liganden 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridyl an Antikörper gekoppelt werden. Hierzu wurde die Dicarbonsäure vor der Komplexsynthese mit einem Carbodiimid und N-Hydroxysuccinimid in den Bis(N-hydroxysuccinimid)diester überführt und anschließend mit 6-Aminoheptansäure zum Säureamid umgesetzt. Die Rutheniumkomplexe wurden nach der Methode von Bannwarth [5] in Dimethylformamid unter Zusatz von Diisopropylethylamin mit TSTU zum Succinimidylester aktiviert und zu einer Lösung des Antikörpers in einem Boratpuffer pH 8.2 gegeben. Die direkte Kopplung des Antikörpers an den Rutheniumkomplexe  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})]$  über die aromatischen Carboxylfunktionen mit Hilfe verschiedener aus der Peptidsynthese bekannter Aktivierungsmittel (BOP, TNTU, TSTU, EDC) gelang

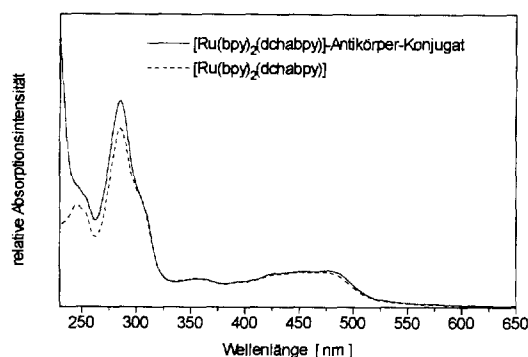


Abb. 2. Vergleichende Darstellung der Absorptionsspektren des  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy}(\text{AHS})_2)]$ -Antikörper-Konjugats und des freien Rutheniumkomplexes.

nicht. Während sich die Aktivierung von  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dchabpy})]$  mit Reversed-Phase HPLC verfolgen ließ, war bei  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})]$  keine Aktivierung feststellbar.

Nicht umgesetzte Mengen der Rutheniumverbindung wurden durch Gelfiltration von dem Antikörperkonjugat getrennt. Antikörper besitzen in der Regel mehrere reaktionsfähige Aminogruppen. Die Antikörperfraktion kann daher sowohl einfach als auch mehrfach markierte neben unmarkierten Molekülen enthalten. Im UV/Vis-Spektrum des Konjugats ist eine im Vergleich zum freien Komplex erhöhte Absorption im UV-Bereich feststellbar, die auf den Antikörper zurückzuführen ist (Abb. 2). Die Absorption im sichtbaren Bereich, die Metal-to-Ligand-Charge-Transfer-Übergängen (MLCT) der Rutheniumkomplexe zugeordnet werden [3,24], zeigt keine Veränderungen. Die Emissionsdaten der freien Rutheniumverbindungen sind in Tabelle 1, die der Kon-

jugate in Tabelle 2 aufgeführt. Ein 1:1 Rutheniumkomplex-Antikörper-Gemisch zeigte das gleiche Emissionsmaximum und die gleiche Lumineszenzlebensdauer wie der freie Farbstoff, so daß davon ausgegangen werden kann, daß keine adsorptive sondern tatsächlich eine kovalente Bindung vorliegt.

Die Lumineszenzabklingkurven der Konjugate sind deutlich länger als die der freien Rutheniumkomplexe und können bis auf einen Fall nicht mehr mit monoexponentiellen Zerfallsfunktionen beschrieben werden. Dieser Effekt wurde von Vos et al. bei der Kopplung von Ruthenium(II)-Komplexen an Poly-L-Lysin und Rinder Serumalbumin ebenfalls beobachtet [6]. Er wird darauf zurückgeführt, daß sich die Moleküle in einer mehr hydrophoben Umgebung befinden und daher Wechselwirkungen mit Wasser, die eine verstärkte strahlungslose Desaktivierung verursachen, eine geringere Rolle spielen. Auch bei Konjugaten von organischen Fluoreszenzfarbstoffen mit Antikörpern wird vom Auftauchen einer 'zweiten Komponente' berichtet [15]. Die biexponentiellen Zerfallsfunktionen liefern zwar eine gute Anpassung und lassen sich damit veranschaulichen, daß der Farbstoff sowohl in polaren als auch in unpolaren Bereichen des Antikörpers gebunden sein und ein unterschiedliches Abklingverhalten zeigen kann, es ist jedoch anzunehmen, daß es sich dabei um eine Mittelung aus vielen Komponenten handelt. Der mit seinen sechs Carboxylgruppen recht polare Komplex  $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{dchabpy})]$  zeigt auch nach der Kopplung noch ein monoexponentielles Abklingen der Lumineszenz. Möglicherweise werden die hydrophoben Bipyridingerüste dieses Komplexes durch die Carboxylfunktionen weitgehend nach außen abgeschirmt und

Tabelle 1

Lumineszenzeigenschaften der mit Amino-hexansäure modifizierten Komplexe in 0.1 M wäßriger Salzlösung pH 7.4 bei Raumtemperatur (21 °C)

Komplex	Emissionsmaximum (nm)	Lebensdauer (ns)	$I/I_{\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2}$
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dchabpy})]$	667	280	0.48
$[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{dchabpy})]$	652	385	0.87
$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dchabpy})]$	661	362	0.69
$[\text{Ru}(\text{dphphen})_2(\text{dchabpy})]$	670	312	0.67

Tabelle 2

Lumineszenzeigenschaften der Rutheniumkomplex-Antikörper-Konjugate in 0.1 M wäßriger Salzlösung pH 7.4 bei Raumtemperatur (21 °C),  $I_0$ : Lumineszenzintensität des freien Komplexes,  $\tau_{\text{AV}}$ : mittlere Lebensdauer

Antikörper-Konjugat	Emissionsmaximum (nm)	Lebensdauer	$I/I_0$
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dchabpy})]$	672	$A_1 = 0.743, \tau_1 = 302 \text{ ns}$ $A_2 = 0.257, \tau_2 = 578 \text{ ns}$ $\tau_{\text{AV}} = 412 \text{ ns}$	1.39
$[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2(\text{dchabpy})]$	650	$\tau = 460 \text{ ns}$	1.26
$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dchabpy})]$	663	$A_1 = 0.203, \tau_1 = 192 \text{ ns}$ $A_2 = 0.797, \tau_2 = 509 \text{ ns}$ $\tau_{\text{AV}} = 481 \text{ ns}$	1.05
$[\text{Ru}(\text{dphphen})_2(\text{dchabpy})]$	659	$A_1 = 0.593, \tau_1 = 544 \text{ ns}$ $A_2 = 0.407, \tau_2 = 1098 \text{ ns}$ $\tau_{\text{AV}} = 866 \text{ ns}$	6.08

Tabelle 3

Einfluß von Natriumdodekylsulfat (SDS) auf die Lumineszenzeigenschaften,  $\lambda_{em}$ : Emissionsmaximum,  $\tau_0$ : Lebensdauer in SDS-freier Lösung,  $I_0$ : Intensität in SDS-freier Lösung

Komplex	$\lambda_{em,SDS}$ (nm)	$\tau_{SDS}$ (ns)	$\tau/\tau_0$	$I/I_0$
[Ru(bpy) <sub>2</sub> (dcbpy)(AHS) <sub>2</sub> ]	660	463	1.65	2.33
[Ru(dcbpy) <sub>2</sub> (dcbpy)(AHS) <sub>2</sub> ]	654	387	1.01	1.04
[Ru(phen) <sub>2</sub> (dcbpy)(AHS) <sub>2</sub> ]	653	645	1.78	2.66
[Ru(dphphen) <sub>2</sub> (dcbpy)(AHS) <sub>2</sub> ]	646	743	2.38	4.25

tragen nicht mehr zu den Wechselwirkungen mit der Umgebung bei. Die relativen Lumineszenzintensitäten nehmen in allen Fällen zu, die des sehr hydrophoben, in Wasser unlöslichen [Ru(dphphen)<sub>2</sub>(dchabpy)] sogar um das Sechsfache. Es ist bekannt, daß die strahlungslose Desaktivierung durch hydroxyliche Lösungsmittel begünstigt wird [21,24]. Die Einlagerung der Komplexe in unpolare Regionen des Antikörpers könnte daher erhöhte Quantenausbeuten zur Folge haben.

Die hydrophoben Eigenschaften der Rutheniumkomplexe zeigen sich auch in Experimenten, bei denen das Micellen bildende Detergenz Natriumdodekylsulfat zugegeben wurde (Tabelle 3). Die relative Lumineszenzintensität und die Lebensdauer bleiben nur im Falle des [Ru(dcbpy)<sub>2</sub>(dchabpy)] unverändert, und liegen sonst deutlich über den in reinem PBS gemessenen Werten. Auch das Emissionsmaximum der Verbindung bleibt nahezu unverändert, während für die übrigen Komplexe eine deutliche hypsochrome Verschiebung zu beobachten ist. [Ru(dphphen)<sub>2</sub>(dchabpy)] zeigt im Antikörperkonjugat ebenfalls eine ausgeprägte hypsochrome Verschiebung.

Für den Einsatz als Lumineszenzmarker zum Nachweis verschiedener Analyte ist es wichtig, daß sich die Komplexe auch nach der Konjugation noch anhand ihrer Lumineszenzabklingkurven zuordnen lassen. Die Unterschiede zwischen den Lumineszenzabklingkurven sind aus Abb. 3 ersichtlich. Die Meßpunkte von [Ru(phen)<sub>2</sub>(dchabpy)] und [Ru(dcbpy)<sub>2</sub>(dchabpy)]

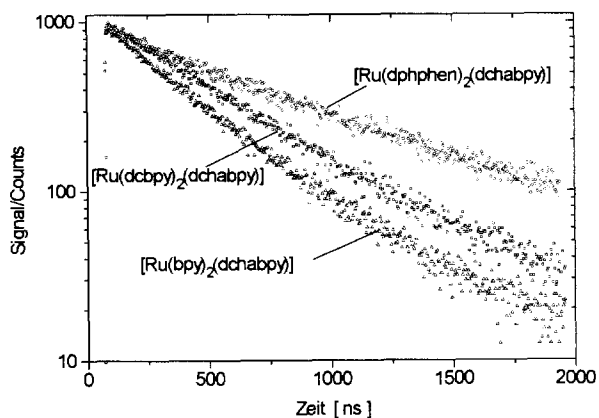


Abb. 3. Vergleichende Darstellung der Lumineszenzabklingkurven verschiedener Rutheniumkomplex-Antikörper-Konjugate.

überlagern sich stark, so daß der besseren Übersicht wegen nur eine der beiden Verbindungen berücksichtigt wurde.

Durch Austausch oder Modifizierung der Liganden sollten sich weitere unterscheidbare Rutheniumkomplexe herstellen lassen. Über den Einfluß verschiedener Substituenten am Bipyridin- bzw. Phenanthrolingerüst auf die Lumineszenzeigenschaften wird von verschiedenen Autoren berichtet [21,22,25], allerdings gibt es kaum systematische Untersuchungen in luftgesättigten, wäßrigen Systemen, die Rückschlüsse auf den Einfluß bestimmter Liganden auf die Lumineszenzeigenschaften erlauben. Nach den bisherigen Erkenntnissen läßt sich mit Ruthenium-Tris(polypyridin)-Komplexe ein Lebensdauerbereich von etwa zweihundert Nanosekunden bis zu einigen Mikrosekunden abdecken. Durch den Austausch eines aromatischen  $\alpha$ -Diiminliganden gegen schwächer koordinierende Liganden läßt sich die Energie des MLCT-Übergangs absenken und die Lumineszenzlebensdauer auf wenige Nanosekunden reduzieren [22]. Damit geht jedoch eine Verringerung der ohnehin schon relativ niedrigen Lumineszenzquantenausbeute einher, die für Rutheniumkomplexe mit Abklingzeiten unter hundert Nanosekunden im Promillebereich liegt [22]. Durch Kombination mit geeigneten organischen Fluoreszenzfarbstoffen mit Lebensdauern zwischen einer und hundert Nanosekunden läßt sich jedoch ein Sortiment von Lumineszenzmarkern zusammenstellen, die über einen breiten Lebensdauerbereich verteilt liegen, leicht unterscheidbar und somit für eine simultanen Nachweis mehrerer Substanzen gut geeignet sein sollten [26].

## Dank

Wir danken dem Bundesministerium für Forschung und Technologie für die finanzielle Unterstützung unter den Projekten 0310183 A und 0310921 A sowie dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Doktorandenstipendium.

## Literaturverzeichnis

- [1] G. Sprintschnik, H.W. Sprintschnik, P.P. Kirsch, D.G. Whitten, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 4947.
- [2] M.K. Nazeeruddin, A. Kay, I. Rodicio, R. Humphry-Baker, E. Müller, P. Liska, N. Vlachopoulos, M. Grätzel, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 6382.
- [3] J.N. Demas, B.A. DeGraff, *Anal. Chem.* 63 (1991) 829 A.
- [4] I. Klimant, O.S. Wolfbeis, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3160.
- [5] W. Bannwarth, D. Schmidt, R.L. Stallard, C. Hornung, R. Knorr, F. Müller, *Helv. Chim. Acta* 71 (1988) 2085.
- [6] E.M. Ryan, R. O'Kennedy, M.M. Feeny, J.M. Kelly, J.G. Vos, *Bioconj. Chem.* 3 (1992) 285.
- [7] H.J. Youn, E. Terpetschnig, H. Szmecinski, J.R. Lakowicz, *Anal. Biochem.* 232 (1995) 24.

- [8] E. Soini, I. Hemmilä, *Clin. Chem.* 25 (1979) 353.
- [9] R. Rigler, J. Wildgren, *Bioscience* (1990) 180.
- [10] M. Sauer, K.H. Drexhage, C. Zander, J. Wolfrum, *Chem. Phys. Lett.* 254 (1996) 223.
- [11] A. Mayer, S. Neuenhofer, *Angew. Chem.* 106 (1994) 1097.
- [12] Y.-Y. Xu, K. Pettersson, K. Blomberg, I. Hemmilä, H. Mikola, T. Lövgren, *Clin. Chem.* 38 (1992) 2038.
- [13] M. Sauer, K.-T. Han, R. Müller, A. Schulz, R. Tadday, S. Seeger, J. Wolfrum, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N.J. Marx, K.H. Drexhage, *J. Fluoresc.* 3 (1993) 131.
- [14] S. Seeger, G. Bachteler, K.H. Drexhage, J. Arden-Jacob, G. Deltau, K. Galla, K.-T. Han, R. Müller, M. Köllner, A. Rumphorst, M. Sauer, A. Schulz, J. Wolfrum, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 97 (1993) 1542.
- [15] K. Galla, J. Arden-Jacob, G. Deltau, K.H. Drexhage, M. Martin, M. Sauer, J. Wolfrum, S. Seeger, *J. Fluoresc.* 4 (1994) 111.
- [16] M. Köllner, A. Fischer, J. Arden-Jacob, K.-H. Drexhage, R. Müller, S. Seeger, J. Wolfrum, *Chem. Phys. Lett.* 250 (1996) 355.
- [17] I. Hemmilä, *Clin. Chem.* 31 (1985) 359.
- [18] A.J. Lees, *Chem. Rev.* 87 (1987) 711.
- [19] F.S. Richardson, *Chem. Rev.* 82 (1982) 541.
- [20] J. Telser, K.A. Cruickshank, K.S. Schanze, T.L. Netzel, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 7221.
- [21] M.J. Cook, A.P. Lewis, G.S.G. McAuliffe, V. Skarda, A.J. Thomson, J.L. Gasper, D.J. Robbins, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* (1984) 1293.
- [22] K. Kalyanasundaram, Md.K. Nazeeruddin, *Chem. Phys. Lett.* 193 (1992) 292.
- [23] S.W. Snyder, S.L. Buell, J.N. Demas, B.A. DeGraff, *J. Phys. Chem.* 93 (1989) 5265.
- [24] T.J. Meyer, *Pure Appl. Chem.* 58 (1986) 1193.
- [25] P.C. Alford, M.J. Cook, A.P. Lewis, G.S.G. McAuliffe, V. Skarda, A.J. Thomson, J.L. Gasper, D.J. Robbins, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* (1985) 705.
- [26] B. Ullrich, S. Seeger, J. Wolfrum, *Proc. SPIE* 2629 (1995) 88.