

Ein System aus Reduktions- und Oxidationsmittel verringert Photobleichen und Blinken von Fluoreszenzfarbstoffen**

Jan Vogelsang, Robert Kasper, Christian Steinhauer, Britta Person, Mike Heilemann, Markus Sauer und Philip Tinnefeld*

Die außerordentliche Selektivität, Empfindlichkeit und räumliche Auflösung der Fluoreszenzspektroskopie und der Fluoreszenzmikroskopie haben zu einer großen Zahl von Anwendungen geführt. Mit der Entwicklung von Detektoren, die in der Lage sind, einzelne Photonen mit nahezu 100 % Quantenausbeute nachzuweisen, und der Verfügbarkeit hochwertiger Optik liegt die Beschränkung der heutigen Fluoreszenzmikroskopie bei den verwendeten Fluorophoren, die blinken und rasch ausbleichen. Die meisten der grundlegenden Farbstoffstrukturen, die heutzutage in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden, sind bereits bekannt, seit sie für die Entwicklung von Farbstofflasern genutzt wurden.^[1] Die steigenden Anforderungen, die die Fluoreszenzmikroskopie bei Anwendungen auf Einzelmolekülebene und bei hochauflösenden Anwendungen stellt,^[2,3] haben dazu geführt, dass neue Arten von Emittern entwickelt wurden, wie Halbleiter-Nanokristalle, Silber-Nanocluster oder neue Derivate fluoreszierender Proteine.^[4] Demgegenüber besteht in der Weiterentwicklung von klassischen organischen Farbstoffen wie Rhodamin- oder Cyanin-Derivaten ein Nachholbedarf, trotz einiger Fortschritte im Bezug auf die Markierungschemie, die Wasserlöslichkeit und die Verfügbarkeit heller und photostabiler nah-infraroter Farbstoffe. Ansätze für Verbesserungen umfassen erhöhte Helligkeit von Multichromophorsystemen, intramolekulares Triplett-Löschen und verringerte Anfälligkeit für Reaktionen mit Singulett-Sauerstoff.^[5] Aus verschiedenen Gründen ist bisher keiner dieser Ansätze nachhaltig in der Fluoreszenzmikroskopie etabliert worden.

Hier stellen wir einen neuen Ansatz vor, Photozerstörung und Blinken zu reduzieren, indem wir reaktive Zwischenzustände schnell entvölkern. Die Methode basiert auf dem

Entzug von Sauerstoff und der Löschung von Triplett- wie ladungsseparierten Zuständen durch Elektronentransferreaktionen. Dafür werden Umgebungsbedingungen gewählt, die sowohl reduzierende als auch oxidierende Komponenten enthalten, d.h. ein reduzierendes und oxidierendes System (ROXS). Der Erfolg dieses Ansatzes wird mithilfe der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie von Oligonucleotiden, die mit unterschiedlichen Fluorophoren wie Cyaninen, (Carbo-)rhodaminen und Oxazinen markiert sind, demonstriert. In wässriger Lösung können so einzelne Fluorophore bei moderater Anregungsleistung minutenlang und mit verbesserter Fluoreszenzhelligkeit beobachtet werden. Thermodynamische Betrachtungen der zugrunde liegenden Redoxreaktionen stützen das Modell und geben ein umfassendes Bild vom Blinken und von der Photozerstörung organischer Fluorophore.

Üblicherweise wird die Photophysik eines Fluorophors durch ein Dreizustandsmodell beschrieben, das neben dem Grundzustand (S_0) und dem ersten angeregten Singulett-Zustand (S_1) auch den tiefsten Triplett-Zustand (T_1) enthält. Aufgrund seiner längeren Lebensdauer ist der T_1 der photochemisch aktivste Zustand. Beim Löschen des T_1 durch molekularen Sauerstoff kann reaktiver Singulett-Sauerstoff entstehen. Deshalb wird bei Anwendungen mit hohen Anforderungen der Sauerstoff z.B. durch Zugabe eines sauerstoffverbrauchenden Enzyms entfernt.^[6] Die Entfernung des Sauerstoffs hat allerdings den Nachteil, dass die Lebensdauer des Triplett-Zustands erhöht wird, was sich negativ auf die Helligkeit des Fluorophors auswirkt. Zusätzlich steigt die Wahrscheinlichkeit von anderen Nebenreaktionen, die den Triplett-Zustand entvölkern. Alternativ dazu wurden Reduktionsmittel wie Ascorbinsäure (AA), *N*-Propylgallat, β -Mercaptoethanol oder Trolox (TX) verwendet, um photoionisierte Fluorophore zurückzuführen und den Singulett-Sauerstoff zu entfernen. Der Erfolg dieser Strategie hängt allerdings stark vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff ab, und manchmal wird die Photozerstörung sogar verstärkt.^[7–9]

Dieses ambivalente Verhalten wird veranschaulicht durch Einzelmolekül-Fluoreszenzspuren von immobilisierter DNA, an die entweder MR121 oder ATTO647N gebunden ist. Die Messungen wurden in Phosphatpuffer (PBS, pH 7.4) mit und ohne Zugabe von 2 mM TX durchgeführt (Abbildung 1) (experimentelle Details sind in den Hintergrundinformationen verfügbar). Das Oxazin-Derivat MR121 zeigt unter diesen Bedingungen einige Sekunden lang stabile Fluoreszenz und seltene Aus-Zustände (Abbildung 1a). Das Carborhodamin-Derivat ATTO647N weist dagegen unter identischen Bedingungen lange Aus-Zustände von einigen hundert Millisekunden auf (Abbildung 1c). Die Zugabe von TX führt zu

[*] J. Vogelsang,^[‡] C. Steinhauer, Dr. B. Person, Prof. Dr. P. Tinnefeld
Angewandte Physik – Biophysik und Center for NanoScience
Ludwig-Maximilians-Universität
Amalienstraße 54, 80799 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-2050
E-Mail: Philip.Tinnefeld@lmu.de

R. Kasper,^[‡] Dr. M. Heilemann, Prof. Dr. M. Sauer
Angew. Laserphysik und Laserspektroskopie, Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)

[†] Die Autoren trugen in gleicher Weise zu dieser Arbeit bei.

[**] Wir danken K. H. Drexhage für die Bereitstellung des Oxazin-Derivats MR121 und C. Forthmann für Hilfe bei der Datenanalyse. Gefördert wurde das Projekt von der DFG (SFB613), dem Biophotonic-III-Programm des BMBF/VDI (Bewilligung 13N9234) und dem Exzellenzcluster Nanosystems Initiative Munich (NIM).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200801518> zu finden.

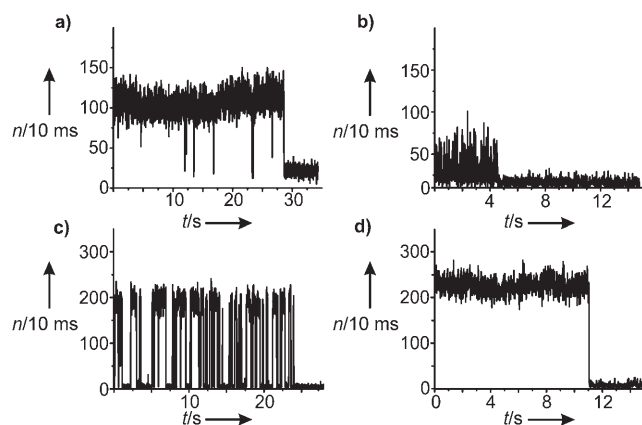


Abbildung 1. Einzelmolekül-Fluoreszenzspuren an farbstoffmarkierter, immobilisierter DNA, gemessen in PBS (a, c) und in PBS mit 2 mM Trolox (b, d). Fluoreszenzspuren von MR121 sind in (a) und (b) dargestellt, die von ATTO647N in (c) und (d).

stabiler Emission von ATTO647N (Abbildung 1 d), wohingegen MR121 verstärktes Blinken und eine geringere Photostabilität aufweist (Abbildung 1 b). Um diese Ambivalenz aufzuheben, gehen wir nach dem folgenden Gedankengang vor: Zuerst muss der Sauerstoff entfernt werden, da er in Abhängigkeit vom verwendeten Farbstoff die Photostabilität beeinflusst und generell oxidative Eigenschaften hat. Als alternativen Triplett-Löschmechanismus schlagen wir die Verwendung von Elektronentransferreaktionen vor. Die Löschung des Triplett-Zustands durch Elektronentransfer erzeugt jedoch radikal-anionische oder -kationische Farbstoffe (hinsichtlich eines als neutral angenommenen Grundzustands). Derart ionisierte Farbstoffe können genauso gut über andere Wege, wie z.B. Photoionisation erzeugt werden und bieten zusätzliche Möglichkeiten eines reaktiven Zwischenzustands auf dem Photozerstörungsweg.^[8,10] Abhängig vom vorherrschenden Photozerstörungsweg können redoxaktive Zusätze die Photozerstörung verzögern oder sogar beschleunigen, abhängig davon, ob der reaktivste Zwischenzustand für einen bestimmten Fluorophor der Triplett-, der reduzierte oder der oxidierte Zustand ist.

Wir stellen hier eine allgemein anwendbare Methode vor, die die Photostabilität verbessert und das Blinken der Fluoreszenzfarbstoffe verringert, wobei sowohl ein Oxidationsmittel als auch ein Reduktionsmittel verwendet wird, um sowohl Triplett- als auch ionisierte Zustände schnell wieder in den Grundzustand zurückzuführen. Das Prinzip, das der Entwicklung des reduzierenden und oxidierenden Systems (ROXS) zugrunde liegt, ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Nach dem Übergang in den T_1 kann der Fluorophor durch das Reduktionsmittel reduziert werden, wobei ein Radikalanion $F^{\cdot-}$ entsteht. Durch das Oxidationsmittel wird das Radikalanion dann schnell reoxidiert, um den Grundzustand wieder zu bevölkern. Alternativ dazu kann der Fluorophor durch das Oxidationsmittel aus dem T_1 oxidiert werden, was zur Bildung eines Radikalzustands $F^{\cdot+}$ führt. Anschließend wird der Fluorophor mithilfe des Reduktionsmittels wieder in den Grundzustand zurückgeführt. Die schnelle Rückführung in den Singulett-Grundzustand ist essenziell, um erfolgreich Nebenreaktionen zu unterbinden, die

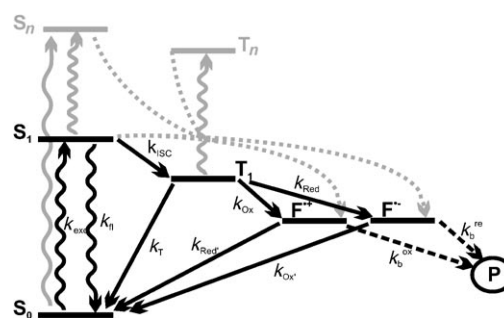


Abbildung 2. Photoinduzierte Prozesse geläufiger organischer Fluorophore. Nach der Anregung in den ersten angeregten Singulett-Zustand (S_1) findet Fluoreszenz mit der Geschwindigkeit k_f statt (unter Vernachlässigung strahlungsloser Prozesse). Interne Übergänge, die mit der Fluoreszenz in Konkurrenz stehen, führen mit der Geschwindigkeit k_{isc} zur Bildung von Triplett-Zuständen (T_1). Mit ROXS wird der Triplett-Zustand durch Elektronentransfer rasch entvölkert. Dies geschieht entweder durch Oxidation, z. B. durch Methylviologen (MV), wodurch ein Radikalkation $F^{\cdot+}$ gebildet wird, oder durch Reduktion, z. B. mithilfe von Ascorbinsäure (AA), was zu einem Radikalanion $F^{\cdot-}$ führt. Die zwei möglichen Radikationen werden durch Reduktion (im Falle eines Radikalkations wird dieses durch AA reduziert) bzw. Oxidation (im Falle eines Radikalanions wird dieses durch MV oxidiert) schnell in den Grundzustand (S_0) zurückgeführt. Diese schnelle Rückführung durch ROXS beugt der Bildung eines photozerstörten Produktes P vor. Höher angeregte Zustände, die hier grau dargestellt sind, können ebenfalls bevölkert werden und zu weiteren Zwischenzuständen führen.^[8,11–13]

zu einem photogelebten Zustand P führen. Wie in Abbildung 2 grau dargestellt, gibt es weitere Möglichkeiten, ein Radikalanion zu erzeugen, diese werden aber in diesem Zusammenhang nicht explizit diskutiert.

Fluoreszenzspuren von ATTO647N, die in wässriger Pufferlösung aufgenommen wurden, verdeutlichen das Konzept (Abbildung 3). Ohne Sauerstoff haben Dunkelzustände von ATTO647N, die Triplett-Zuständen oder aus dem Triplett ionisierten Zuständen zugeordnet werden können, eine Lebensdauer von (28 ± 8) ms (Daten nicht gezeigt). Abbildung 3 a zeigt eine Fluoreszenzspur von ATTO647N nach der Entfernung von Sauerstoff und dem Zusatz von 1 mM des Oxidationsmittels 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium-dichloridhydrat (Methylviologen, MV). Deutliches Blinken auf der Millisekundskaala ist in der vergrößerten Ansicht erkennbar (Abbildung 3 a, links oben). Die Autokorrelation (Abbildung 3 a, rechts oben) und ihre mono-exponentielle Anpassung zeigen einen Aus-Zustand mit einer Lebensdauer von $\tau_{off} = (8 \pm 1)$ ms. Wir führen diesen Aus-Zustand auf photoinduzierte Oxidation und die Bildung eines Radikalkations zurück. Die Bildung von Radikalkationen bei Cyaninen und Rhodaminen mit Lebensdauern im Millisekundenbereich ist bereits seit den 70er Jahren bekannt, als diese durch Blitzlichtphotolyse bestimmt wurden,^[14] und wird auch auf der Ebene einzelner Moleküle diskutiert.^[15] Hier wird jedoch gezeigt, dass Blinken aufgrund reversiblen Elektronentransfers zu einer mono-exponentiellen Kinetik führt.^[10,16] Analog dazu weist ATTO647N nach Entfernung von Sauerstoff und Zusatz von 1 mM des Reduktionsmittels AA ähnliches Blinkverhalten auf, jetzt verursacht durch die reversible Bildung von Radikalanionen ($\tau_{off} = (28 \pm 7)$ ms). Die Rückfüh-

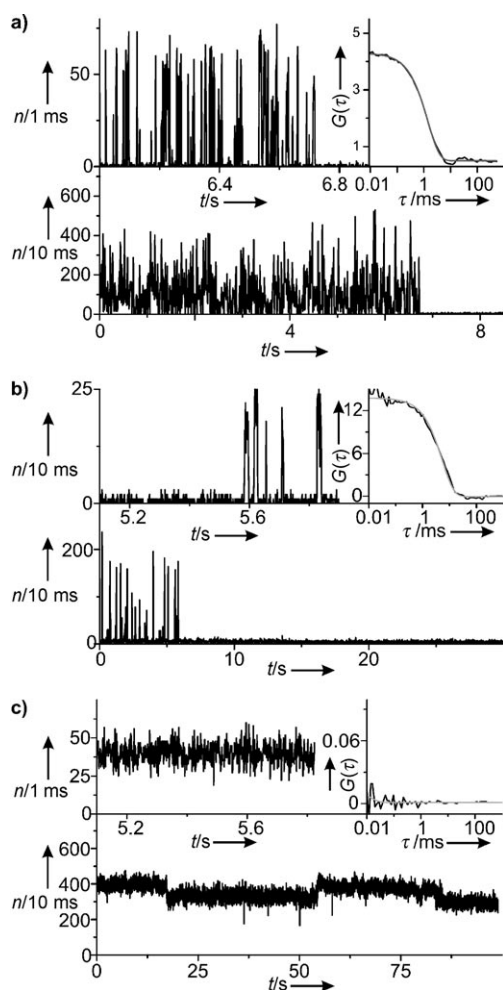


Abbildung 3. Fluoreszenzspuren von an immobilisierter DNA gebundenem ATTO647N in wässriger Umgebung: a) Sauerstoff entfernt plus 1 mM MV; b) Sauerstoff entfernt plus 1 mM AA; c) Sauerstoff entfernt plus 1 mM MV und 1 mM AA. Die Integrationszeit der unteren Spur beträgt 10 ms. Die Spur links oben zeigt eine vergrößerte Ansicht mit 1 ms Auflösung, rechts oben ist die Autokorrelationsfunktion zweiter Ordnung $G(t)$ mit einer mono-exponentiellen Anpassung dargestellt. Die Proben wurden bei 635 nm mit einer mittleren Anregungsintensität von ca. 2 kW cm^{-2} angeregt.

rung des Aus-Zustands auf die jeweiligen Radikationen wird durch die Spur in Abbildung 3c belegt. Diese Fluoreszenzspur von ATTO647N nach Entfernung von Sauerstoff und Zugabe sowohl von AA (1 mM), als auch von MV (1 mM) zeigt nahezu kein Blinken während der 100 s Aufnahmezeit.

Durch spektral aufgelöste Messungen wurden die beiden Zustände leicht unterschiedlicher Fluoreszenzintensität (Abbildung 3c) seltenen Übergängen zwischen zwei spektral verschiedenen, aber anderweitig photophysikalisch ähnlichen Zuständen des Fluorophors zugeordnet (Daten nicht gezeigt). Der Eindruck, dass über das Hintergrundrauschen hinaus keine weiteren Intensitätsfluktuationen auftreten, wird sowohl durch die vergrößerte Fluoreszenzspur als auch durch die Autokorrelationsfunktion der Intensität gestützt. Diese weist bis hinab zu $1 \mu\text{s}$ keine charakteristische Zeitkonstante auf (Abbildung 3c). Einhergehend mit dem reduzierten Blinken wechselt das Molekül effizienter zwischen

den Zuständen S_0 und S_1 hin und her, was zu einer höheren Fluoreszenzhelligkeit einzelner ATTO647N-Moleküle führt. Die Tatsache, dass sich die Photostabilität durch die Anwesenheit von ROXS verbessert, stützt die Annahme, dass die Aus-Zustände eng mit dem Photozerstörungsweg verbunden sind.^[10]

Ähnliche Ergebnisse werden auch für andere Fluorophore verschiedener Klassen und Spektralbereiche, z. B. Cy5, Alexa647, Cy3B und ATTO565, erzielt (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Diese Fluorophore zeigen ähnliches Blinkverhalten bei Anwesenheit von entweder dem Reduktionsmittel oder dem Oxidationsmittel. Durch die gleichzeitige Anwesenheit von Reduktionsmittel und Oxidationsmittel kann das Blinken dagegen effizient vermieden werden.

Das simultane Verwenden von Reduktionsmittel und Oxidationsmittel mag paradox und unintuitiv erscheinen. Deshalb diskutieren wir im Folgenden die zugrunde liegenden thermodynamischen Prinzipien. Trotz der Tendenz von Reduktionsmittel und Oxidationsmittel, Elektronen abzugeben oder aufzunehmen, ist für den photoinduzierten Elektronentransfer die Energie des absorbierten Photons zwingend notwendig. Aufgrund ihrer Redoxpotentiale reagieren Reduktions- und Oxidationsmittel nicht in einer Grundzustandselektronentransferreaktion. Aus Sicht der Thermodynamik muss die Energie aus der Photonenabsorption ausreichen, um den vollen Zyklus über T_1 , einen ladungsseparierten Zustand und zurück zum Grundzustand anzutreiben. Die Absorption liefert die Null-Null-Übergangsenergie $E_{0,0}$, die im Fall von Cy5 bei ungefähr 1.88 eV liegt. 280 meV gehen beim Übergang in den Triplett-Zustand verloren, der für Cy5 bei 1.60 eV liegt.^[20] Mithilfe der Rehm-Weller-Gleichung^[21] lässt sich die Änderung der freien Enthalpie für die Ladungstrennung abschätzen: $\Delta G_{LT} = e[E_{ox} - E_{red}] - E_{0,0} + C$, wobei E_{ox} und E_{red} das erste Einelektronenoxidationspotential des Donors bzw. das erste Einelektronenreduktionspotential des Akzeptors sind, die cyclovoltammetrisch bestimmt wurden.^[13] e ist die Elementarladung. Die lösungsmittelabhängige Coulomb-Wechselwirkungsenergie C kann in Betracht der hohen Polarität des Wassers vernachlässigt werden. Im Fall einer Reduktion des T_1 von Cy5 durch AA erhält man mit $E_{red}(\text{Cy5 gegen SCE}) = -0.45 \text{ V}$ und $E_{ox}(\text{AA gegen SCE}) = 0.06 \text{ V}$ ^[22] den Wert $\Delta G_{LT} = -0.70 \text{ eV}$. In gleicher Weise ist die Oxidation des Cy5-Triplett-Zustands ebenfalls exergonisch ($E_{ox}(\text{Cy5}) = 0.97 \text{ V}$, $E_{red}(\text{MV}) = -0.45 \text{ V}$)^[23] mit $\Delta G = -0.18 \text{ eV}$. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass der Triplett-Zustand bei Cy5 durch AA genauso wie durch MV durch Elektronentransfer gelöscht wird.

Im nächsten Schritt schätzen wir ab, ob bei Cy5 der ladungsseparierte Zustand durch ROXS effizient in den Grundzustand zurückgeführt werden kann. Dafür vergleichen wir das Reduktionspotenzial von Cy5 mit dem Reduktionspotenzial von MV und erhalten so die freie Enthalpie der Ladungsrekombination $\Delta G_{LR} = -0.39 \text{ eV}$ für das Cy5-Radikalanion. Analog erhalten wir aus den Oxidationspotentialen von Cy5 und AA den Wert $\Delta G_{LR} = -0.93 \text{ eV}$ für das Cy5-Radikalkation. Die Tatsache, dass alle berechneten Reaktionsschritte sowohl für Ladungstrennung, als auch für Ladungsrekombination exergonisch sind, ist in Übereinstim-

mung mit den in Abbildung 3 und Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen dargestellten Ergebnissen. Analoge Rechnungen für ATTO647N führen ebenfalls zu negativen Werten der freien Enthalpie für die verschiedenen Reaktionsschritte (mit $E_{0,0} = 1.0$ eV, $E_{ox} = 1.11$ V, $E_{red} = -0.64$ V,^[13] E_{T1} als ca. 1.6–1.7 eV angenommen). Interessanterweise führt dieselbe Rechnung bei dem Oxazin-Derivat MR121, das ein sehr hohes Reduktionspotential von $E_{red} = -0.45$ V hat, zu einem positiven Wert der freien Enthalpie. Dementsprechend sollte sich reduziertes MR121 nicht von MV ($E_{red} = -0.45$ V) in den Grundzustand zurückführen lassen. In der Tat weisen Einzelmolekül-Fluoreszenzspuren von an DNA gebundenem MR121 unter ROXS-Bedingungen häufiges Blinken auf, das von ROXS nicht vollständig verhindert wird (Abbildung S2). Außerdem konnten wir feststellen, dass das Blinken von Alexa532 zwar reduziert, aber nicht vollständig unterbunden wird, wobei es große Unterschiede von Molekül zu Molekül gibt (Daten nicht gezeigt).

Um den Effekt der verbesserten Photostabilität zu quantifizieren, verwendeten wir Fluoreszenz-Bildgebung mit Anregung über totale interne Reflexion (TIRF) an einzelnen immobilisierten Molekülen. Die parallele Detektion von etwa 100 Molekülen pro Film ermöglicht die schnelle Erzeugung einer Photozerstörungsstatistik. Im Standardprotokoll wurde eine Anregungsintensität von 150 W cm^{-2} bei 647 bzw. 531 nm verwendet, und Filme von bis zu 20 Minuten wurden aufgenommen (siehe Hintergrundinformationen). In den meisten Fällen konnten die Photozerstörungskurven für kleine Zeiten gut mit einer mono-exponentiellen Anpassung angenähert werden (Abbildung S3a). Aus der Zeitkonstanten der Anpassungen und der Helligkeit der Moleküle wurde die mittlere Anzahl Photonen bestimmt, die pro Molekül detektiert wurden. Um die ROXS-Bedingungen zu optimieren, variierten wir bei den Messungen mit Cy5 die Konzentrationen von Reduktions- und Oxidationsmittel (siehe Abbildung S3b,c). Dabei fanden wir ein Stabilitätsmaximum bei 1 mM Reduktionsmittel und 1 mM Oxidationsmittel. Obwohl das Stabilitätsmaximum von den spezifischen Photozerstörungswegen der unterschiedlichen Farbstoffe abhängen sollte, verwendeten wir diese Konzentrationen als ROXS-Referenz. Danach verglichen wir die Photostabilitäten für verschiedene Fluorophore bei unterschiedlichen Bedingungen: 1) in PBS-Puffer sowie nach der Entfernung von Sauerstoff und zusätzlich 2) nach Zugabe von 1 mM AA, 3) nach Zugabe von 1 mM MV und 4) nach Zugabe von ROXS (1 mM AA und 1 mM MV). Die mittlere Gesamtzahl an Photonen der verschiedenen Fluorophore ist in Abbildung 4a und b dargestellt. In den Fällen, in denen kein Balken sichtbar ist, liegt die Photonenzahl unter 1000 (z.B. Cy5 in PBS). Für alle Fluorophore, mit Ausnahme des Oxazin-Derivats MR121, fanden wir bei der Verwendung von ROXS höhere Photostabilitäten als in PBS-Lösung. Darüber hinaus verbessert sich die Photostabilität aller Fluorophore bei der gleichzeitigen Verwendung von Reduktions- und Oxidationsmittel gegenüber der Verwendung von entweder nur dem Reduktions- oder nur dem Oxidationsmittel. In Abwesenheit von Sauerstoff werden im Mittel weniger als 1000 Photonen für einzelne ATTO647N-Moleküle gemessen. Mit 1 mM MV oder 1 mM AA alleine ist die mittlere Photonenzahl immer noch kleiner

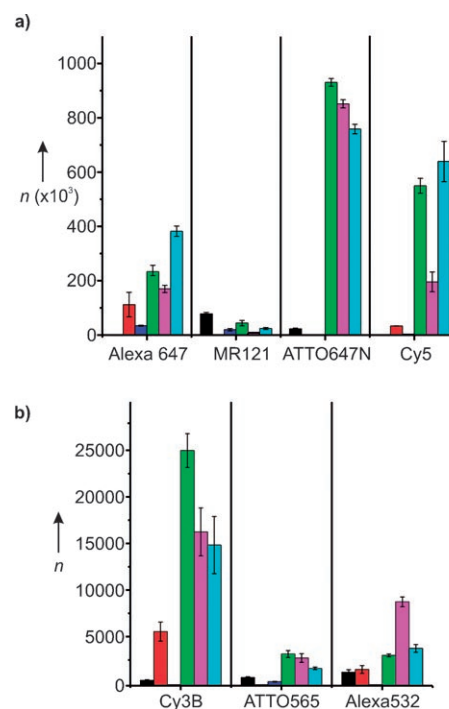


Abbildung 4. Mittlere Photonenzahl pro Molekül für a) die roten Fluorophore Alexa647, MR121, ATTO647N und Cy5 sowie b) die grünen bzw. gelben Fluorophore Cy3B, ATTO565 und Alexa532. Die Daten wurden mit TIRF-Mikroskopie aus je mindestens drei Photobleichfilmen gewonnen. Die Messungen wurden in PBS (schwarze Balken) oder mit sauerstoffentzogenem PBS mit 1 mM AA (rot), 1 mM MV (dunkelblau), ROXS (1 mM AA plus 1 mM MV (grün) oder 2 mM TX plus 1 mM MV (hellblau)) oder 2 mM TX (magenta) durchgeführt.

als 1000. Nach der Zugabe von sowohl MV als auch AA wird jedoch ein synergetischer Effekt beobachtet, und die Photonenzahl steigt auf $(8.40 \pm 0.13) \times 10^5$. Dies belegt, dass die Photostabilität von Fluorophoren durch die Beigabe der richtigen Kombination aus Reduktions- und Oxidationsmittel stark erhöht werden kann (z. B. um einen Faktor von über 800 bei ATTO647N). Einen ähnlichen Effekt bezüglich der Verringerung des Blinkens fanden wir auch für Fluorophore mit kürzerem Wellenlängenbereich, z.B. Cy3B und ATTO565, der photostabilisierende Effekt war aber nicht so stark ausgeprägt (Abbildung 4b). Bisher beschriebene photophysikalische Eigenschaften hingen dagegen eher von der Farbstoffklasse des Fluorophors ab.^[12,13] Bei ROXS scheint die Null-Null-Energie des niedrigsten elektronischen Übergangs die Photostabilität zu dominieren. Das könnte mit der Tatsache zusammenhängen, dass höher angeregte elektronische Zustände, die durch kürzere Anregungswellenlängen bevölkert werden, alternative Photozerstörungswege eröffnen.

Es ist wichtig, die Verringerung von Blinken und Photobleichen mit den erfolgreichsten und empirisch gefundenen Konzepten zu vergleichen, die in der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie verwendet werden. Rasnik et al. wiesen nach, dass TX die Photostabilität verbessert und dabei auch die Dunkelzustände löscht, was es von anderen Reduktionsmitteln wie AA oder Propylgallat abhebt.^[9] Wir führten konzentrationsabhängige Messungen durch, um das Blinkverhalten bei TX, AA und ROXS zu vergleichen (Abbil-

dung 5). Um die Wechselwirkung mit Aus-Zeiten, die durch *cis-trans*-Isomerisierung verursacht sind, zu vermeiden, verwendeten wir für diese Messungen das Carborhodamin ATTO647N. Wie in Abbildung 5 dargestellt, haben ver-

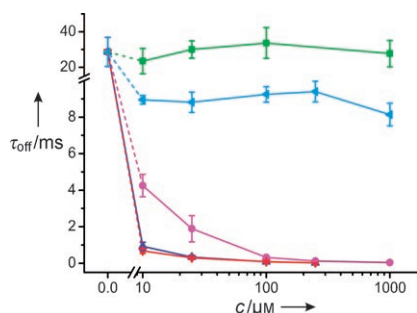


Abbildung 5. Abhängigkeit der Lebensdauer τ_{off} des Aus-Zustands von ATTO647N von der Konzentration von Elektronentransferlöschern in sauerstoffbereinigter Lösung. AA (grün), MV (hellblau), TX (magenta), AA plus MV (dunkelblau) und TX plus MV (rot) wurden als Triplett-Löcher verwendet.

schiedene Konzentrationen von AA oder MV alleine keinen signifikanten Einfluss auf die Aus-Zeiten von ATTO647N, was gemäß dem ROXS-Modell auch zu erwarten war (Abbildung 2). Mit ROXS dagegen sinkt die Dauer der Aus-Zeiten bereits bei einer Konzentration von 10 μM deutlich. Bei einer Konzentration im millimolaren Bereich lässt sich bis zu 1 μs hinab kein Aus-Zustand detektieren. Diese Ergebnisse stützen ferner die These, dass Radikationen gebildet werden, die bei Anwesenheit von Reduktions- und Oxidationsmittel schnell wieder zurückgeführt werden. Es ist allgemein akzeptiert, dass TX auch den Triplett-Zustand durch Elektronentransfer löscht (siehe z.B. Lit. [22]). Interessanterweise kann TX auch die Aus-Zeiten von ATTO647N (siehe Abbildung 5) und anderen untersuchten Fluorophoren verkürzen. Die Effizienz dieser überraschenden Fähigkeit ist jedoch um den Faktor 4 bis 6 geringer als bei ROXS. Es ist also eine fünffach höhere Konzentration von TX notwendig, um das Unterbinden des Blinkens mit gleicher Effizienz zu erreichen wie bei ROXS. Da die Geschwindigkeit der Dunkelzustandslöschung von TX plus MV (rote Datenpunkte in Abbildung 5) höher ist als mit TX allein oder mit AA plus MV (tatsächlich ist es die Summe der letzten beiden Geschwindigkeiten), vermuten wir, dass die Löscheigenschaften bei TX nach einem ähnlichen Mechanismus ablaufen wie bei ROXS. In Übereinstimmung damit erhöht TX auch die Photostabilität der meisten Fluorophore (Abbildung 4, rosa Balken). Eine Kombination mit MV ist in einigen Fällen ebenfalls erfolgreich (Abbildung 4, hellblaue Balken).

Für Anwendungen des ROXS-Konzepts könnte es nützlich sein, anstatt TX eine Kombination aus AA und MV zu verwenden, da der blinkverringende Effekt bereits bei niedrigeren Konzentrationen eintritt, bei einigen Fluorophoren eine höhere Photostabilität erreicht wird und sowohl AA als auch MV eine bessere Wasserlöslichkeit aufweisen. Dabei ist es wichtig, dass die Zusätze, insbesondere das giftige Oxidationsmittel MV, nicht mit der biomolekularen Funktionsweise in Wechselwirkung treten. Wie in jedem anderen

hochwertigen Experiment muss der Einfluss von ROXS für jede spezifische Anwendung durch entsprechende Kontrollexperimente abgesichert werden. Das mögliche Immobilisieren auf der Oberfläche, der erfolgreiche enzymatische Sauerstoffentzug sowie das Untersuchen der Dynamik von Holliday-Junctions,^[24] die unabhängig von der MV-Konzentration ist (siehe Abbildung S4), zeigen jedoch, dass viele biologische Funktionen nicht von ROXS in millimolarer Konzentration beeinflusst werden.

Photozerstörung ist eine der schwerwiegendsten Einschränkungen moderner Fluoreszenzspektroskopie und Bildgebungstechniken. Die neuartige ROXS-Strategie weist klare Vorteile auf: Die Photostabilität organischer Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedlicher Klassen kann in wässriger Umgebung beträchtlich verbessert werden. Gleichzeitig wird das Blinken deutlich reduziert, was Fluoreszenzspektroskopie und Bildgebung bei höheren Fluoreszenzraten über lange Zeiten ermöglicht. Das zugrunde liegende vereinheitlichende Konzept ist ein neuartiger Ansatz für die Vermeidung des Photobleichens und ein Schritt weg von der rein empirischen Suche nach photostabilisierenden Rezepten. Das Modell, den Triplett-Zustand und die oxidierten und reduzierten Zustände schnell zu entvölkern, wird durch Ergebnisse aus der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie genauso gestützt wie durch thermodynamische Überlegungen. Da ROXS eine Reihe von unterschiedlichen Photozerstörungswegen auf einmal unterbinden kann, ist die Methode allgemein anwendbar und sollte breite Anwendung in moderner Fluoreszenzspektroskopie und der Fluoreszenzbildgebung finden, z.B. in Ansätzen zur Auflösungserhöhung in der Fernfeldmikroskopie.^[3]

Eingegangen am 1. April 2008

Stichwörter: Einzelmolekülspektroskopie · Elektronentransfer · Fluoreszenz · Mikroskopie · Photozerstörung

- [1] *Dye Lasers* (Hrsg.: F. P. Schäfer), Springer, Berlin, **1973**.
- [2] R. Yuste, *Nat. Methods* **2005**, 2, 902; S. Weiss, *Science* **1999**, 283, 1676; P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2698; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2642.
- [3] S. W. Hell, *Science* **2007**, 316, 1153.
- [4] M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, 281, 2013; X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, 307, 538; T. Vosch, Y. Antoku, J.-C. Hsiang, C. I. Richards, J. I. Gonzalez, R. M. Dickson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 12616; B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science* **2006**, 312, 217.
- [5] B. Liphardt, B. Liphardt, W. Luttko, *Opt. Commun.* **1983**, 48, 129; B. Liphardt, B. Liphardt, W. Luttko, *Opt. Commun.* **1981**, 38, 207.
- [6] Y. Harada, K. Sakurada, T. Aoki, D. D. Thomas, T. Yanagida, *J. Mol. Biol.* **1990**, 216, 49.
- [7] T. Ha, *Methods* **2001**, 25, 78.
- [8] J. Widengren, A. Chmyrov, C. Eggeling, P. A. Lofdahl, C. A. M. Seidel, *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, 429.
- [9] I. Rasnik, S. A. McKinney, T. Ha, *Nat. Methods* **2006**, 3, 891.
- [10] J. P. Hoogenboom, E. M. H. P. van Dijk, J. Hernandez, N. F. van Hulst, M. F. Garcia-Parajo, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, 95, 097401.

- [11] C. Eggeling, J. Widengren, L. Brand, J. Schaffer, S. Felekyan, C. A. M. Seidel, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 2979; C. Eggeling, A. Volkmer, C. A. M. Seidel, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 791; X. Kong, E. Nir, K. Hamadani, S. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4643.
- [12] M. Heilemann, R. Kasper, P. Tinnefeld, M. Sauer, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16864.
- [13] R. Kasper, M. Heilemann, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **2007**, 6633, 66331Z1.
- [14] A. K. Chibisov, *J. Photochem.* **1977**, *6*, 199; V. E. Korobov, A. K. Chibisov, *J. Photochem.* **1978**, *9*, 411.
- [15] A. Kiel, J. Kovacs, A. Mokhir, R. Kramer, D. P. Herten, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3427; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5049; T. Vosch, M. Cotlet, J. Hofkens, K. Van Biest, M. Lor, K. Weston, P. Tinnefeld, M. Sauer, L. Latterini, K. Muellen, F. C. De Schryver, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 6920; H. P. Lu, X. S. Xie, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 2753; M. W. Holman, R. Liu, D. M. Adams, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12649; R. Liu, M. W. Holman, L. Zang, D. M. Adams, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 6522; M. Cotlet, T. Vosch, S. Habuchi, T. Weil, K. Muellen, J. Hofkens, F. De Schryver, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9760; M. Cotlet, S. Masuo, G. Luo, J. Hofkens, M. van der Auweraer, J. Verhoeven, K. Muellen, X. S. Xie, F. de Schryver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14343; R. Zondervan, F. Kulzer, S. B. Orlinskii, M. Orrit, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 6770.
- [16] E. K. L. Yeow, S. M. Melnikov, T. D. M. Bell, F. C. De Schryver, J. Hofkens, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 1726; J. Schuster, F. Cichos, C. von Borczyskowski, *Opt. Spectrosc.* **2005**, *98*, 712.
- [17] M. Heilemann, E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3801.
- [18] P. Tinnefeld, V. Buschmann, K. D. Weston, M. Sauer, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 323.
- [19] J. Widengren, P. Schwille, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 6416.
- [20] Z. Huang, D. Ji, A. Xia, F. Koberling, M. Patting, R. Erdmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8064.
- [21] D. Rehm, A. Weller, *Isr. J. Chem.* **1970**, *8*, 259.
- [22] C. R. Lambert, I. E. Kochevar, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66*, 15.
- [23] G. J. Kavarnos, *Fundamentals of Photoinduced Electron Transfer*, Wiley, New York, **1993**.
- [24] S. A. McKinney, A.-C. Declais, D. M. J. Lilley, T. Ha, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 93; S. Hohng, R. B. Zhou, M. K. Nahas, J. Yu, K. Schulten, D. M. J. Lilley, T. J. Ha, *Science* **2007**, *318*, 279.