



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 34 572 T2** 2007.04.26

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 042 676 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 34 572.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/25349**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 956 756.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/025139**

(86) PCT-Anmeldetag: **27.10.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **04.05.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.10.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **27.12.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.04.2007**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/68** (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

105839 P **27.10.1998** **US**

113828 P **23.12.1998** **US**

126346 P **26.03.1999** **US**

(73) Patentinhaber:

Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg., US

(74) Vertreter:

Koepe & Partner Patentanwälte, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

BHALGAT, K., Mahesh, Ballwin, MO 63021, US;

DIWU, Zhenjun, Eugene, OR 97405, US;

HAUGLAND, P., Richard, Eugene, OR 97405, US;

PATTON, F., Wayne, Eugene, OR 97405, US

(54) Bezeichnung: **ÜBERGANGSMETALLKOMPLEX-HALTIGE LUMINESZENTE PROTEINFARBEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf das Anfärben von Poly(aminosäuren), was Peptide, Polypeptide und Proteine einschließt, zum Beispiel in Gelen oder auf Festphasen, mit neutralen oder anionischen Übergangsmetallkomplexen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Poly(aminosäuren) werden normalerweise mit Gelelektrophorese, quantitativen Tests in Lösung oder auf festen Trägern, wie zum Beispiel auf Filtermembranen, detektiert und charakterisiert. Kleine Proteinmengen oder andere Poly(aminosäuren) sind normalerweise mit bloßem Auge nicht sichtbar und müssen deshalb, bevor sie lokalisiert und identifiziert werden können, angefärbt werden.

[0003] Zwei der am meisten verwendeten Methoden für das Anfärben von Poly(aminosäuren) in Gelen sind das Färben mit Coomassie Brilliant Blue (CBB) und die Silberfärbung. Für bestimmte Poly(aminosäuren) ist die Silberfärbung bis zu ungefähr 100–1000 Mal empfindlicher als eine Färbung mit CBB, beide Methoden haben jedoch Nachteile. Durch den Gebrauch von lumineszierenden Reagenzien für die Proteindetektion kann eine außerordentliche Erhöhung der Empfindlichkeit, eine Zunahme des linearen Messbereichs während der Detektion und gleichzeitig eine einfachere Handhabung des Färbereagens erreicht werden. Dabei ist mit „Lumineszenz“ jedes Reagenz, das fluoresziert, phosphoresziert oder chemoluminesziert gemeint ist.

[0004] Fluoreszierende Reagenzien wurden schon früher zum Anfärben von Poly(aminosäuren) benutzt, allerdings besitzen organische Farbstoffe normalerweise ein hohes Hintergrundrauschen. Es wurden Europium-Komplexe sulfonierter Bathophenanthroline entwickelt, die eine „zeitaufgelöste Detektion“ erlauben und die Beeinträchtigung durch Hintergrundrauschen reduzieren (M. J. Lim et al., Anal. Bioch., 245, 184–195, 1997 und WO 97/20213). Diese Europium-Komplexe können nicht leicht mit sichtbarem Licht angeregt werden, sondern brauchen ultraviolette Strahlung für eine optimale Lumineszenz. Folglich können sie nicht mit kommerziell erhältlichen Laser-angeregten Gel-Scannern benutzt werden. Zusätzlich binden die Europium-Komplexe reversibel an Proteine und zerfallen bei niedrigen Konzentrationen.

[0005] Photochem. Photobiol, 67, 179–183 offenbart eine Lumineszenz-Sonde, die das sulfonierte Analogon der gut bekannten Sauerstoff-Sonde $(\text{Ru}[\text{dpp}]_3)_2\text{Cl}_2$ für die Detektion von gelöstem Sauerstoff in einer wässrigen Lösung bei pH = 7,2 ist, wobei dpp für 4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin steht.

[0006] Anal. Biochem., 88, 434–441 offenbart einen Fe-Bathophenanthrolin-Sulfonat-Komplex für die Detektion von Proteinen. Die Färbeformulierung enthält einen Metallkomplex, ein organisches Lösungsmittel und eine saure Komponente. Das Limit für eine Detektion beträgt hierbei 1 bis 2 µg bezogen auf BSA.

[0007] Meth. Enzym., 278, 295–321 beschreibt den Gebrauch von bestimmten an Proteine kovalent gebundenen Ru-Komplexen für die Detektion von Analyten in der Fluoreszenzpolarisation und Fluoreszenzanisotropie.

[0008] Die verwendeten Übergangsmetallkomplexe der vorliegenden Erfindung besitzen eine neutrale oder negative Gesamtladung. Die Komplexe sind sehr stabil, sogar in verdünnter Lösung und binden stark an Proteine in Lösung, an Membranen, an Zellen und an Elektrophoresegelen und bringen eine klare, langlebige und sichtbare Lumineszenz hervor. Die vorliegenden Metallkomplexe binden sogar in neutraler und in basischer Lösung stark und nicht-kovalent an Proteine und besitzen eine höhere Empfindlichkeit für die Detektion von Poly(aminosäuren) als alle anderen oben beschriebenen Methoden und können mit ultraviolettem Licht und mit Licht des sichtbaren Bereichs angeregt werden. Der Gebrauch von neutralen oder anionischen Komplexen dieser Erfindung als nicht-kovalente Proteinfärbemittel ist bisher noch nicht beschrieben worden.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0009] [Abb. 1](#): Excitationsspektren einer 10 µM wässrigen Lösung von Verbindung 1, 150 µM Zitronensäure.

[0010] [Abb. 2](#): Emissionsspektren einer 10 µM wässrigen Lösung von Verbindung 1, 150 µM Zitronensäure nach Anregung bei 440 nm.

[0011] [Abb. 3](#): Exitationsspektren einer 10 µM wässrigen Lösung von Verbindung 3.

[0012] [Abb. 4](#): Emissionsspekten einer 10 µM wässrigen Lösung von Verbindung 3 nach Anregung bei 385 nm.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG UND BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0013] Die Erfindung bezieht sich auf das Anfärben von Poly(aminosäuren) mit Metall-Ligand-Komplexen. Das Metall ist ein Übergangsmetall der Gruppen 7–10 mit einer Atomzahl über 42 und ist mit einer Vielzahl von Stickstoff-Donor-Liganden koordiniert, von denen wenigstens einer sulfoniert ist. Die Liganden, die sich einander gleichen oder sich voneinander unterscheiden können, sind jeweils substituierte oder unsubstituierte Reste von Pyridin, Bipyridin, Bispyridin, Terpyridin, Phenanthrolin, Bathophenanthrolin, Imidazol, Pyrrol, Pyrazol, Indazol, Triazol, Pyrazin, Pyrimidin, Pyridazin, Purin, Porphyrin oder Phthalocyanin, wobei bei den Liganden ein stickstoffhaltige Ringe optional zu einem aromatischen Ring geschlossen werden kann. Die Erfindung wird in den nachfolgenden Patentansprüchen dargelegt. Ausführungsformen sind in den abhängigen Ansprüchen beschrieben.

Der Metallkomplex

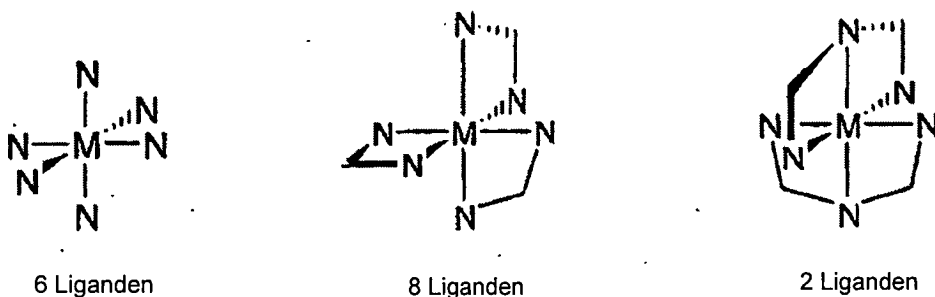
[0014] Die Methode der Erfindung verwendet eine Färbelösung, die einen oder mehrere Metall-Ligand-Komplexe enthält. Das Metallion ist normalerweise ein Übergangsmetall der Gruppen 7, 8, 9, oder 10 mit einer Atomzahl größer als 42, wobei das Übergangsmetall eine beliebige Elektronenkonfiguration besitzt, die kompatibel zum bindenden Stickstoffdonor-Liganden ist. In einer Ausführungsform hat das Metallion eine d^6 -Elektronenkonfiguration, wie zum Beispiel das Rhenium(I)-, Ruthenium(II)-, Osmium(II)-, Rhodium(III)- oder das Iridium(III)-Ion. In einer anderen Ausführung hat das Metallion d^6 -Elektronenkonfiguration, wie zum Beispiel das Platin(II)-Ion.

[0015] In einer Ausführung der Erfindung ist das Metall Ruthenium(II), Osmium(II), Rhenium(I) oder Platin(II). In einer anderen Ausführung ist das Metallion Ruthenium(II) oder Rhenium(I). In noch einer anderen Ausführung ist das Metallion Ruthenium(II).

[0016] In einigen Ausführungsformen ist das Übergangsmetall ein radioaktives Isotop, welches natürliche Radioaktivität besitzt, wie zum Beispiel Ru^{103} , Ru^{106} oder Tc^{99} . Wenn der Metallkomplex der Erfindung radioaktiv ist, ist der Komplex geeignet für die Proteindetektion entweder mittels Lumineszenz oder Radiographie oder mit beiden Methoden.

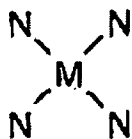
[0017] Die in dieser Erfindung verwendeten Liganden besetzen die Koordinationssphäre des Übergangsmetalls und sind Stickstoffdonor-Liganden, die mit wenigstens einer weiteren Sulfonatgruppe substituiert sind.

[0018] Die in dieser Erfindung verwendeten Metallkomplexe enthalten ein Metallion oder mehrere Metallionen. In einer Ausführung hat das Metallion oktaedrische oder quadratisch-planare Geometrie. Wenn das Metallion oktaedrische Geometrie besitzt, sind die Stickstoffatome der Donor-Liganden an den Eckpunkten eines Oktaeders angeordnet, mit dem Metallion in der Mitte des Oktaeders. Solche Metallionen, wie sie in dieser Erfindung benutzt werden, können sechs Monodentat-Liganden, drei Bidentat-Liganden oder zwei Tridentat-Liganden, wie unten gezeigt, binden oder sogar einen einzelnen Hexadentat-Liganden. Alternativ besitzt der Metallkomplex eine Mischung der verschiedenen Liganden.

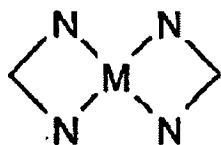


[0019] Wenn die in der Erfindung benutzten Metallkomplexe quadratisch-planar sind, liegen die Stickstoffatome in den Ecken eines Quadrats mit dem Metallion im Zentrum. Solche Metallionen können vier Monoden-

tat-Liganden oder zwei Bidentat-Liganden, wie unten gezeigt, binden:



4 Liganden



2 Liganden

[0020] Obwohl die Geometrie eines gegebenen Metallzentrums, welches in der Erfindung genutzt wird, in drei Dimensionen existiert, werden die in der Erfindung vorgestellten Komplexe der Einfachheit halber nur in zwei Dimensionen behandelt. Wie für oktaedrische Metallkomplexe gut bekannt, kann der Komplex zum Beispiel aus einem einzigen Stereoisomer oder einer Mischung aus Stereoisomeren bestehen. Die Absolutkonfiguration der Liganden um das Metallion herum beeinflusst nicht die Fähigkeit des Komplexes, Poly(aminosäuren) einzufärben.

[0021] Ein gegebener Metallkomplex kann optional mehrere Liganden der gleichen chemischen Formel enthalten oder enthält mehr als einen strukturell unterscheidbaren Liganden, wie zum Beispiel einen Komplex, der aus einem Bidentat-Liganden in Kombination mit vier Monodentat-Liganden oder ein Tridentat-Ligand in Kombination mit einem Bidentat- und einem Monodentat-Ligand oder eine Kombination der drei unterschiedlichen Liganden besteht. Der Metallkomplex kann optional Liganden enthalten, die von einem oder mehreren anionischen Resten substituiert oder von keinem anionischen Rest substituiert ist. Die Liganden binden optional gleichzeitig an zwei oder mehr Metallionen und wirken als Brückenliganden. Das wird besonders dadurch erreicht, dass ein Stickstoff-Donor-Ligand benutzt wird, der sich an die Metallbindungsstelle anpassen kann (z.B. Verbindung 5). Wenn der Metallkomplex mehr als ein Metallion enthält, hat jedes Metallion optional dieselbe oder eine verschiedene Koordinationsgeometrie.

[0022] Die in der vorliegenden Erfindung benutzten Liganden sind aromatische Stickstoff-Donor-Liganden und umfassen wenigstens einen heteroaromatischen Ring, der ein Stickstoffatom enthält und über den der Ligand an das Metallatom oder -ion der Erfindung bindet. Die Liganden, die sich einander gleichen oder sich voneinander unterscheiden, sind substituierte oder unsubstituierte Reste: Pyridin, Bipyridin, Bispyridin, Terpyridin, Phenanthrolin, Bathophenanthrolin, Imidazol, Pyrrol, Pyrazol, Indazol, Triazol, Pyrazin, Pyrimidin, Pyridazin, Purin, Porphyrin, Phthalocyanin, von denen sich stickstoffhaltige Ringe optional zu einem geschlossenen Ring zusammenschließen können. In einer Ausführung umfasst der Ligand zwei heteroaromatische Ringe, die über eine Einfachbindung oder über einen geeigneten kovalenten Linker verbunden sind. In einer anderen Ausführung umfasst der Ligand zwei heteroaromatische Ringe, die über eine Einfachbindung oder über einen zusätzlichen geschlossenen aromatischen Ring verbunden sind. In noch einer anderen Ausführung umfasst der Ligand drei heteroaromatische Ringe, die über eine Einfachbindung oder über einen geeigneten kovalenten Linker verbunden sind. In jeder Ausführung sind die heteroaromatischen Ringe optional substituiert und enthalten optional ein oder mehrere zusätzliche Heteroatome wie N, O oder S. Wenn die Liganden der Erfindung mehrere heteroaromatische Ringe enthalten, dann sind sie üblicherweise polydentat und binden über die Stickstoffatome der heteroaromatischen Ringe an dasselbe oder an verschiedene Metallzentren.

[0023] Die in der Erfindung verwendeten Liganden sind optional mit einer großen Vielfalt von Substituenten substituiert, welche die folgenden einschließen: Alkyl, Aryl, Heteroaryl-Substituenten, Alkene, Alkine, Halogene, Ether, Thioether, Amide, Ester, Säuren und stickstoffhaltige Gruppen. In einer Ausführungsform sind die Ligandensubstituenten einfache Substituenten, wie H, Halogen oder CN. In einer anderen Ausführungsform sind die erlaubten Substituenten Alkyl, Perfluoralkyl, Alkoxy-Gruppen, die 1–6 Kohlenstoffatome besitzen, Carboxy (-COOH), Carboxyalkyl, Carboxyalkoxy, Carboxyalkylamino oder Carboxyalkylthio, wobei jeder Rest 2–7 Kohlenstoffatome besitzt. Andere Ligandensubstituenten sind optional Amino, Aminosalze (wobei das Gegenion ein Halogenid, Sulfat, Sulfonat, substituiertes Sulfonat, Phosphat, Perchlorat, Tetrafluoroborat, Tetraphenylborid oder ein Anion einer aromatischen oder aliphatischen Säure ist), Alkylamino oder Dialkylamino, wobei jede Alkylgruppe 1–6 Kohlenstoffatome hat. Noch weitere Liganden sind optional Aryl oder Heteroaryl. Alternativ können zwei oder mehr Ligandensubstituenten in Kombination zusätzliche geschlossene Ringe bilden, die optional selbst mit den oben beschriebenen Substituenten substituiert sind.

[0024] Der hierin verwendete Ausdruck Arylsubstituent ist ein sechsgliedriger aromatischer Ring, der über eine Einfachbindung verbunden ist und typischerweise ein Phenyl- oder substituiertes Phenylrest ist, aber auch einfache aromatische Substituenten, wie etwa Naphthyle und substituierte Naphthyle, umfasst.

[0025] Der Ausdruck Heteroaryl wie hierin verwendet, ist ein aromatische Gruppe, die mindestens ein Hete-

roatom (ein Nicht-Kohlenstoffatom im Ring) enthält. Ein Heteroaryl-Substituent ist optional ein 5- oder 6-gliedriger Ring oder ist Teil einer geschlossen 2- oder 3-Ring-Struktur. Ein Heteroaryl-Substituent enthält optional ein oder mehrere Heteroatom(e), zum Beispiel wie in Pyrrolyl, Pyridyl, Thienyl oder Furanyl (ein Ring, ein Heteroatom) oder Oxazolyl, Isoxazolyl, Oxadiazolyl oder Imidazolyl (ein Ring, viele Heteroatome) oder Benzoxazolyl, Benzothiazolyl oder Benzimidazolyl (mehrere Ringe, mehrere Heteroatome) oder Chinolyl, Benzfuranyl oder Indolyl (mehrere Ringe, ein Heteroatom). Bevorzugte Heteroaryl-Substituenten sind Pyridyl oder Chinolyl.

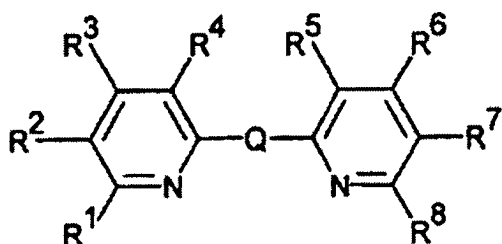
[0026] Aryl- und Heteroaryl-Substituenten werden normalerweise verwendet, um die spektralen Eigenschaften, die Affinität, die Selektivität, die Löslichkeit oder die Reaktivität oder eine Kombination aller dieser Einflussgrößen in den resultierenden Metallkomplexen zu modifizieren. Sowohl Aryl- als auch Heteroaryl-Substituenten der vorliegenden Liganden sind unabhängig und optional substituiert und wie oben für die Liganden der heteroaromatischen Ringe beschrieben, was ein Halogen, eine Sulfonäure oder Sulfonsäuresalze, ein Phosphonat, Phosphat, Boronat, Alkylrest, Perfluoralkylrest, Alkoxy-Gruppen, (die 1–6 Kohlenstoffatome besitzen) oder Carboxy-, Carboxyalkyl-, Carboxyalkoxy-, Cyoboxyalkylamino- oder Carboxyalkylthiogruppen (die 2–7 Kohlenstoffatome haben) einschließt.

[0027] Ringsubstituenten können benutzt werden, um die Löslichkeit des Metallkomplexes in wässriger oder organischer Lösung zu verändern, um spektrale Protein-Protein-Bindungseigenschaften zu modifizieren, oder um die elektronische Umgebung des Metallzentrums zu ändern. Normalerweise gilt: Je größer der Sulfonierungsgrad des Liganden je größer die Löslichkeit des resultierenden Metallkomplexes in wässrigen Systemen. Die zusätzliche Substitution mit Ammoniumsalzen oder Carboxy, Carboxyalkyl, Carboxyalkoxy, Cyoboxyalkylamino oder Carboxyalkylthio oder anderen höher polaren Substituenten resultiert ebenfalls in einer erhöhten wässrigen Löslichkeit, verbesserter Protein-Bindung oder anderen gewünschten Eigenschaften.

[0028] Die Metallkomplexe müssen mindestens einen Liganden besitzen, der mit mindestens einem Sulfonatrest substituiert ist. Mit Sulfonatrest ist gemeint Sulfonsäure ($-\text{SO}_3\text{H}$), Sulfonation ($-\text{SO}_3^-$) oder Sulfonsäuresalze ($-\text{SO}_3\text{X}$, wobei X normalerweise ein Alkalimetallkation oder ein Ammoniumion ist). Üblicherweise wird die Ladung der Sulfonatgruppe durch das Gegenkation oder durch eine Formalladung auf dem Metallion selbst ausgeglichen. Bei physiologischem oder niedrigen pH liegen die Sulfonat-Gruppen normalerweise als Sulfonat-Ion vor. Sulfonierte Metallkomplexe sind üblicherweise in ihrer Gesamtladung neutral oder negativ geladen (in Abwesenheit anderer ionisierbarer Gruppen im Komplex). Zum Beispiel hat ein Ruthenium-(II)-Komplex, der insgesamt 6 Sulfonatreste trägt, eine Gesamtladung von -2 . Ein Ruthenium-(II)-Komplex, der insgesamt 4 Sulfonatreste an allen Liganden trägt, hat eine Gesamtladung von -4 . Die Sulfonatgruppen können entweder direkt an den aromatischen Stickstoff-Heterozyklus gebunden werden oder über einen Ringsubstituenten, wie zum Beispiel Sulfophenyl oder Sulfoalkyl gebunden werden. Der Ort der substituierten Sulfonsäuregruppe ist scheinbar für die Färbereffektivität der resultierenden Metallkomplexe nicht entscheidend, und um die Methode der vorliegenden Erfindung zu überprüfen, funktionieren Komplexe, die Mischungen von Ligandenisomeren haben, normalerweise besser als isomerenfreie Komplexe.

[0029] Die Stickstoff-Donor-Liganden können daher aus Pyridinen, Bipyridinen, Bispyridinen, Terpyridinen, Phenanthrolinen, Bathophenanthrolinen, Imidazolen, Pyrrolen, Pyrazolen, Indazolen, Triazolen, Pyrazinen, Pyrimidinen, Pyridazinen, Purinen, Porphyrinen und Phthalocyaninen ausgewählt werden. In einer Ausführungsform sind die Stickstoff-Donor-Liganden Bipyridine, Bispyridine, Terpyridine, Phenanthroline und Bathophenanthroline. Ein stickstoffhaltiger Ring kann auch an einen aromatischen Ring anneliert sein, zum Beispiel um Benzotriazol oder Bichinolin zu erhalten.

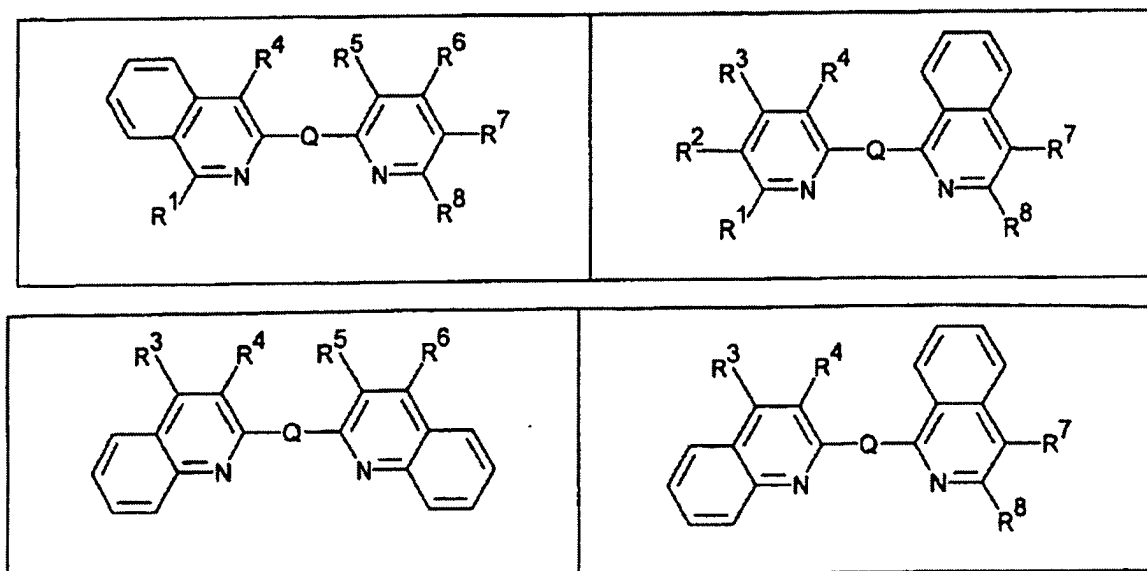
[0030] In einer Ausführungsform besitzen die Liganden mindestens zwei Pyridyl-Ringe gemäß der allgemeinen Formel:



wobei die Pyridyl-Ringe die grundlegenden Ringsubstituenten R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ und R⁸ aufweisen, die unabhängig voneinander ausgewählt werden können aus H, Halogen, einem anionischen Rest, CN, Alkyl, Perfluoralkyl oder Alkoxy-Gruppen, (die 1–6 Kohlenstoffatome besitzen) oder Carboxy ($-\text{COOH}$), Carboxyalkyl,

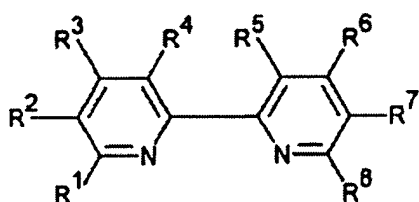
Carboxyalkoxy, Carboxyalkylamino, Carboxyalkylthio (die 2–7 Kohlenstoffatome haben), Amino, Aminosalz (wobei das Gegenion zum Beispiel ein Halogenid, Sulfat, Sulfonat, Phosphat, Perchlorat, Tetrafluoroborat, Tetraphenylborid oder ein Anion einer aromatischen oder aliphatischen Säure sein kann), Alkylamino, oder Dialkylamino (wobei jeder Alkylrest 1–6 Kohlenstoffatome haben kann). Der Ligand ist direkt oder indirekt mit wenigstens einem anionischen Rest, der eine Sulfonsäure oder ein Sulfonsäuresalz ist, substituiert. Andere Ringsubstituenten sind außerdem Aryl und Heteroaryl. Jeder Aryl- oder Heteroarylrest ist optional unabhängig substituiert. Die möglichen Substituenten sind jene, die für R^1 – R^8 aufgezählt wurden. Typischerweise hat der Ligand nicht mehr als zwei Aryl- oder Heteroarylsubstituenten, die üblicherweise an R^1 , R^3 , R^6 und/oder R^8 , vorzugsweise an R^3 und R^6 gebunden sind.

[0031] Zusätzlich zu den obigen Substituenten kann jeder heteroaromatische Ringligand optional zu einem zusätzlichen aromatischen Ring geschlossen werden. Zwei beliebige benachbarte heteroaromatische Ringsubstituenten in Kombination bilden optional einen zusätzlichen geschlossenen aromatischer Ring, zum Beispiel die Kombination R^1 und R^2 oder die Kombination R^5 und R^6 . Es gibt nicht mehr als zwei annelierte aromatische Ringe am Liganden eines heteroaromatischen Ringes. Liganden, die zwei zusätzliche aromatische Ringe besitzen, können symmetrisch oder unsymmetrisch substituiert sein. Die Ringsubstituenten der annelierten aromatischen Ringe werden unabhängig und optional substituiert mit Halogen, einem anionischen Rest, CN, Alkyl, Perfluoralkyl oder Alkoxy, (die 1–6 Kohlenstoffatome besitzen), Amino, Alkylamino (mit 1–6 Kohlenstoffatomen), Dialkylamino (mit 2–12 Kohlenstoffatomen), Carboxy oder Carboxyalkyl, Carboxyalkoxy, Carboxyalkylamino oder Carboxyalkylthio (wobei jeder Rest 2–7 Kohlenstoffatome haben kann). Ausgewählte (aber nicht ausschließliche) Beispiele von einigen Metallionenbindenden Resten mit zusätzlichen annelierten Ringe werden unten gezeigt.



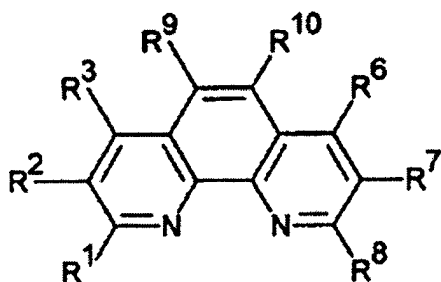
[0032] Die Aryl- und Heteroarylgruppen und zusätzliche Substituenten am annelierten Ringsystem des Liganden dienen optional als Anheftungspunkt für anionische Reste.

[0033] In einer Ausführungsform der Erfindung ist Q eine kovalente Einfachbindung, so dass zum Beispiel der resultierende Ligand ein Bipyridyl-basierter Chelator ist. Liganden, die Bipyridyle darstellen, haben die folgende allgemeine Struktur:



wobei R^1 – R^8 wie vorher definiert sind.

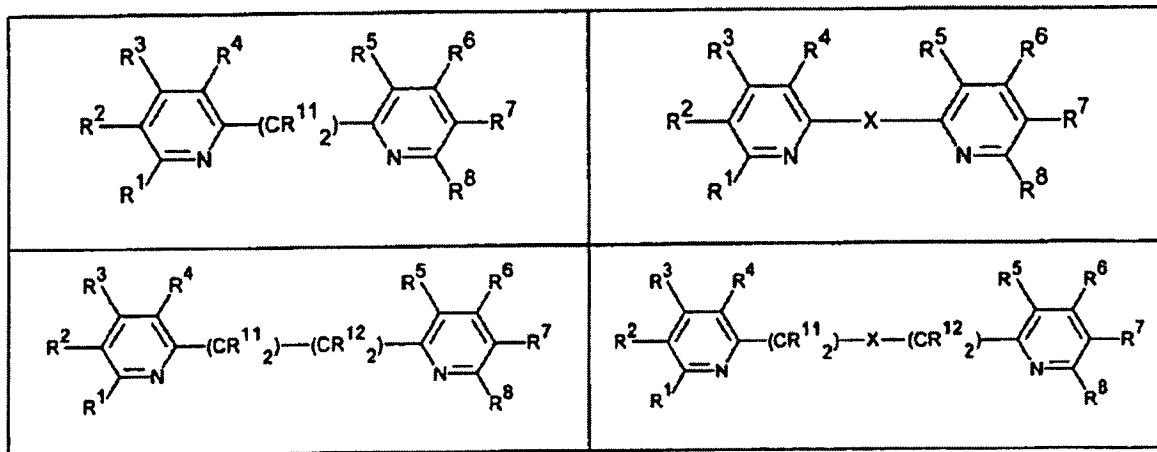
[0034] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist Q eine formale Einfachbindung und R^4 und R^5 in Kombination repräsentieren die Gruppe $-\text{CR}^9=\text{CR}^{10}-$, so dass der Ligand einen aromatischen Phenanthrolin-basierenden Chelator darstellt, der die folgende allgemeine Formel hat:



wobei R^1 – R^3 und R^6 – R^8 wie oben definiert sind und die Phenanthrolin-Substituenten R^9 und R^{10} unabhängig aus H, Alkyl, Perfluoralkyl oder Alkoxy-Gruppen, die 1–6 Kohlenstoffatome besitzen, einer Sulfonsäure, einem Sulfonsäuresalz, einer Amino-, einer Alkylamino- oder Dialkylaminogruppe, wobei jeder Alkylrest 1–6 Kohlenstoffatome hat, Carboxy oder Carboxyalkyl, Carboxyalkoxy, Carboxyalkylamino oder Carboxyalkylthio (die 2–7 Kohlenstoffatome haben), Aryl oder Heteroaryl, Halogen, CN oder einem anionischem Rest ausgewählt werden können. Normalerweise dient einer der Reste R^9 und R^{10} als Anheftungspunkt für eine Sulfonsäure oder ein Sulfonsäuresalz, und alle anderen Ringsubstituenten sind Wasserstoff, Phenyl oder einfach oder mehrfach mit Sulfonsäure oder Sulfonsäuresalzen substituierte Phenylreste. Vorzugsweise sind R^3 oder R^6 oder beide mit Phenyl substituiert, welches selber optional mit einer einzigen Sulfonsäure oder einem Sulfonsäuresalz substituiert ist.

[0035] Falls der Ligand ein Phenanthrolin-basierter Chelator ist, können sich die benachbarten heteroaromatischen Substituenten optional zu zusätzlichen aromatisch-geschlossenen Ringen zusammenschließen, wobei R^4 und R^5 nicht länger zur Verfügung stehen, weitere Ringe mit R^3 und entsprechend mit R^6 zu bilden. Zusätzliche annelierte aromatische Ringe sind deshalb nur dann möglich, wenn die Kombinationen R^1 , R^2 , R^3 , R^6 , R^7 und R^8 benutzt werden. Normalerweise enthält der Phenanthrolin-basierende Ligand keine weiteren geschlossenen Ringe.

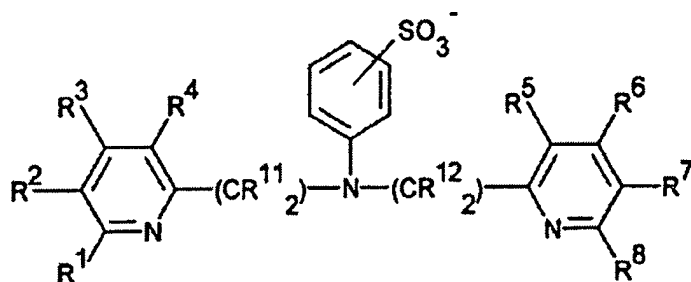
[0036] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist $Q-(CR^{11})_a-X_b-(CR^{12})_c$, so dass der Ligand ein Pyridyl-basierender Chelator ist. In dieser Ausführung sind a, b, und c jeweils 0 oder 1. Ausgewählte Beispiele von Pyridyl-basierenden Liganden sind unten gezeigt.



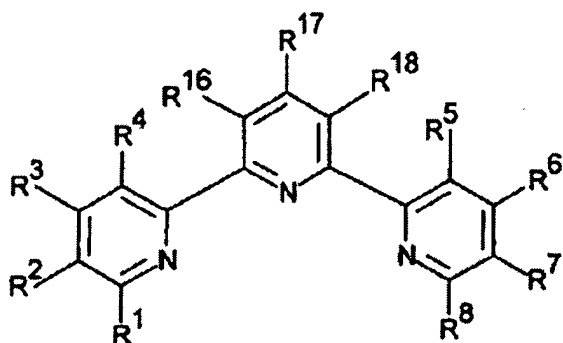
[0037] Jeder Rest aus R^{11} und R^{12} ist optional und unabhängig ein H oder eine Alkylgruppe, die 1–6 Kohlenstoffatome hat. Üblicherweise sind R^{11} und R^{12} Wasserstoffatome.

[0038] Das Element X ist optional O oder S, was eine Etherbrücke oder entsprechend eine Thioetherbrücke ergibt. Alternativ steht X für NR^{13} , wobei R^{13} H, C_1 - C_6 -Alkyl ist. Alternativ ist R^{13} Phenyl, das ferner optional einfach oder mehrfach mit jeder Kombination aus Alkyl, Perfluoralkyl oder Alkoxy, das 1–6 Kohlenstoffatome haben kann, einem anionischen Rest (z.B. Sulfonsäure oder Sulfonsäuresalz), Amino, Alkylamino oder Dialkylamino, wobei jeder Alkylrest 1–6 Kohlenstoffatome hat, Carboxy, Carboxyalkyl, Carboxyalkoxy, Carboxyalkylamino oder Carboxyalkylthio (die 2–7 Kohlenstoffatome haben), Halogen oder mit CN substituiert ist. In noch einer weiteren Ausführungsform ist $X-CR^{14}R^{15}$, was zu einer Trimethylenbrücke führt, wobei R^{14} und R^{15} voneinander unabhängig ein H oder ein Alkylgruppe, die 1–6 Kohlenstoffatome hat, sein können. Zusätzlich dienen entweder R^{14} oder R^{15} voneinander unabhängig als Anknüpfungspunkt für einen anionischen Rest (z.B. Sulfonsäure oder Sulfonsäuresalz). Normalerweise ist $Q-CR^{11}_2-NR^{13}-CR^{12}_2$ und R^{13} ist ein Phenylrest oder ein

substituierter Phenylrest. Wenn R^{13} ein Phenylrest oder ein substituierter Phenylrest ist, kann dieser optional mit einer Sulfonsäure oder einem Sulfonsäuresalz, wie unten gezeigt, substituiert sein:

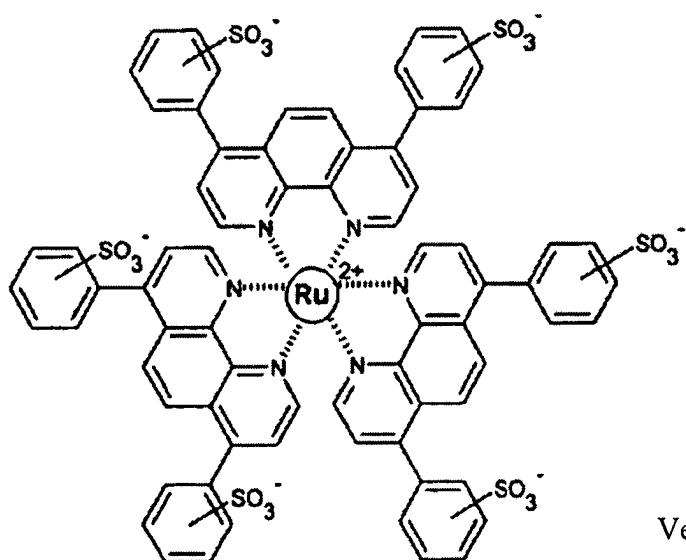


[0039] In einer alternativen Ausführung der Erfindung ist Q ein 2,6-disubstituierter Pyridylrest, was zu einer komplexierenden Terpyridyl-basierenden Gruppe und zur folgenden Struktur führt:

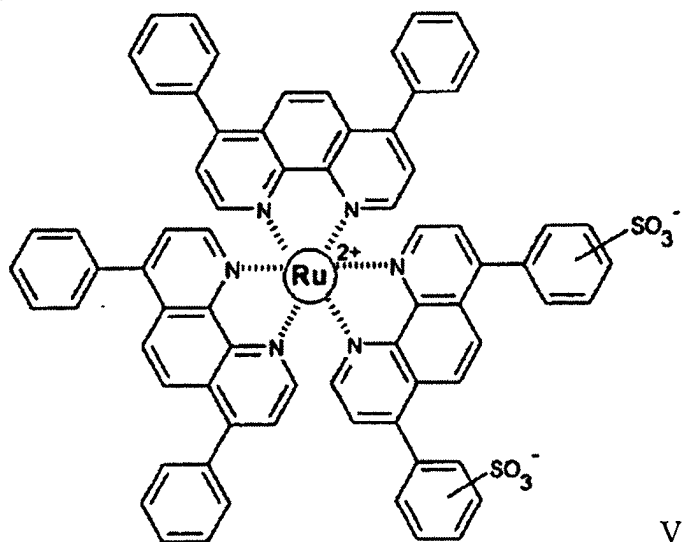


wobei R^1 – R^4 und R^5 – R^8 vorher definierte Gruppen darstellen. In dieser Ausführung können die Substituenten R^{16} , R^{17} und R^{18} unabhängig voneinander aus H, Alkyl, Perfluoralkyl oder Alkoxy, das 1–6 Kohlenstoffatome haben kann, Sulfonsäure oder ein Sulfonsäuresalz, Amino, Alkylamino oder Dialkylamino, wobei jeder Alkylrest 1–6 Kohlenstoffatome hat, Carboxy, Carboxyalkyl, Carboxyalkoxy, Carboxyalkylamino oder Carboxyalkylthio (die 2–7 Kohlenstoffatome haben) oder CN ausgewählt werden. Alternativ dienen einer oder mehrere der Reste aus R^{16} , R^{17} und R^{18} als Anheftungspunkt für eine Sulfonsäure oder ein Sulfonsäuresalz. Normalerweise sind R^{16} , R^{17} und R^{18} Sulfonsäurereste oder Wasserstoffatome. Vorzugsweise sind R^{16} , und R^{18} Wasserstoffatome und R^{17} ist eine Sulfonsäure.

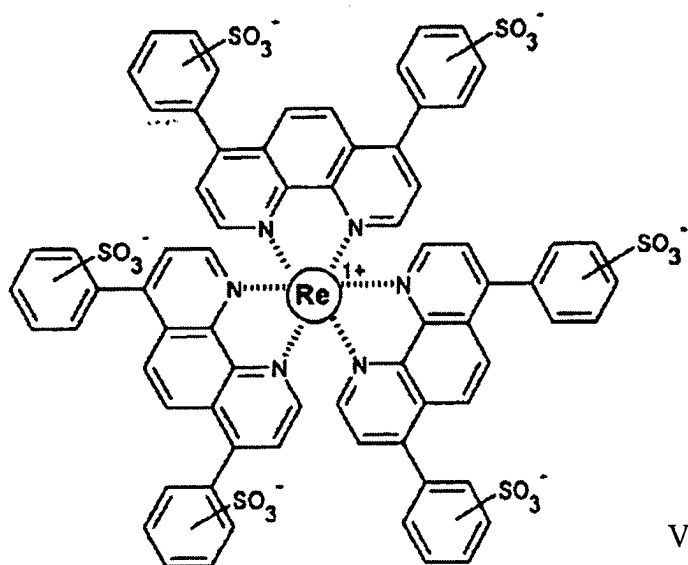
[0040] Für alle Ausführungsformen gilt, dass einer der Liganden des resultierenden Metallkomplexes mit wenigstens einem anionischem Rest substituiert ist und die Gesamtladung des Metall-Liganden-Komplexes 0 oder negativ sein muss. Einige speziell bevorzugte Komplexe sind unten graphisch dargestellt (Verbindungen 1–8):



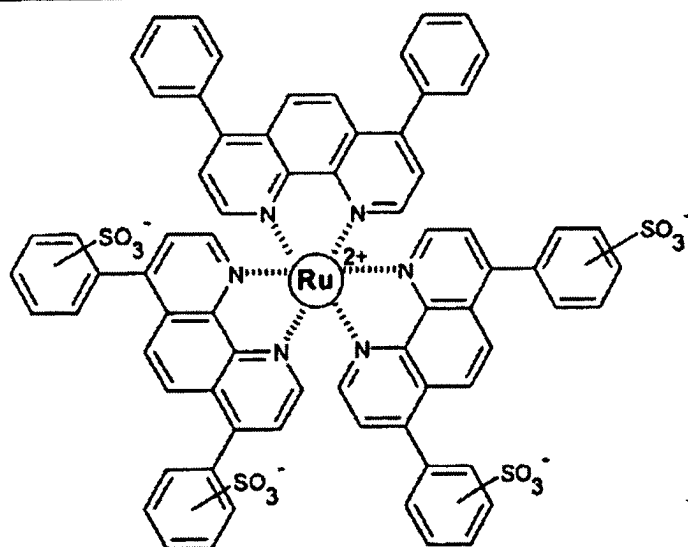
Verbindung 1



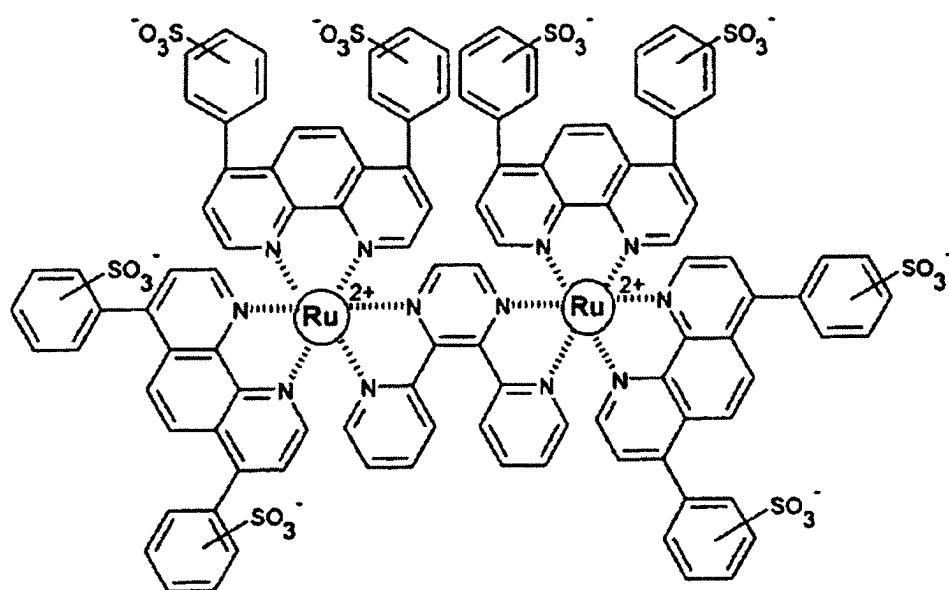
Verbindung 2



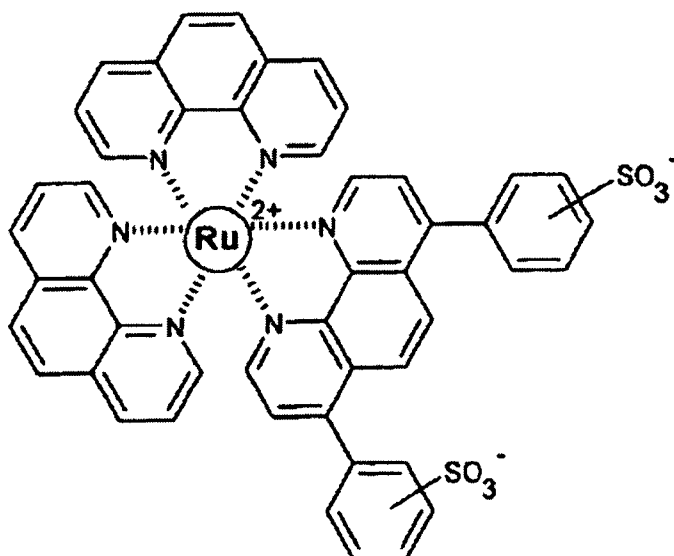
Verbindung 3



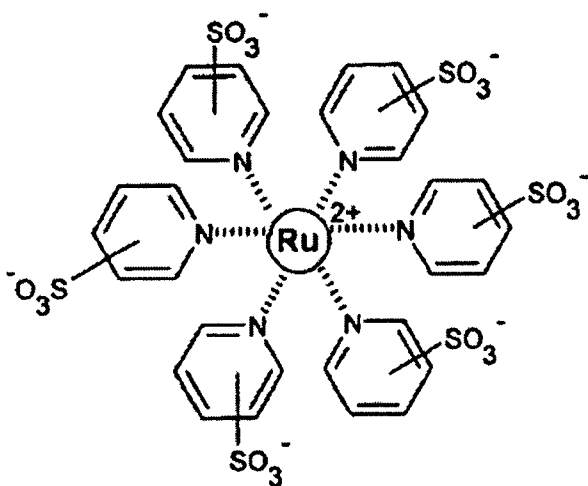
Verbindung 4



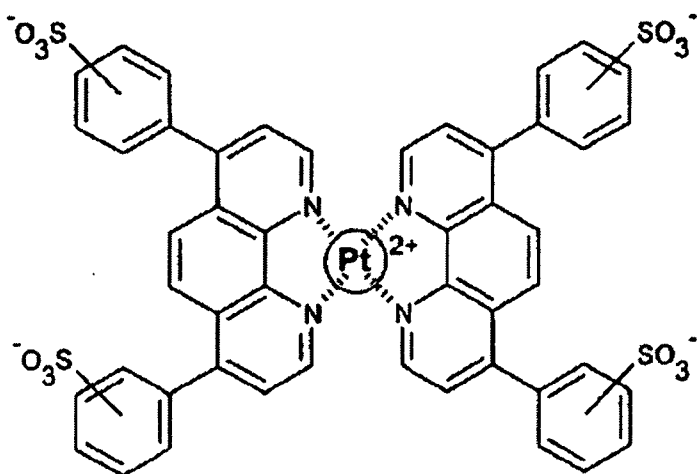
Verbindung 5



Verbindung 6



Verbindung 7



Verbindung 8

Synthesen der Metallkomplexe

[0041] Die Präparation der Übergangsmetallkomplexe von Stickstoff-Donor-Liganden ist nach dem Stand der

Technik gut bekannt. Amine, aromatische Stickstoffheterozyklen und andere Stickstoffderivate sind klassische Liganden in der Koordinationschemie. Übergangsmetalle werden normalerweise über das Donor-Elektronenpaar des Stickstoffs gebunden. Liganden, die mehr als ein Stickstoffatom besitzen, und an ein Metall binden können, sind als polydentate Liganden bekannt. Klassische Beispiele von stickstoffbasierten polydentaten Liganden sind neben anderen Ethylendiamine, Tetramethylethylendiamine, Pyridine, Bipyridine, Terpyridine, Chinoline und Phenanthroline. Diese Stickstoff-Donor-Liganden sind gute Liganden für Übergangsmetalle über eine Bandbreite von Oxidationsstufen (für Beispiele siehe auch: McWhinnie et al., Adv. Inorg. Chem. Radiochem., 12, 135, 1969).

[0042] Die Herstellung von Übergangsmetallkomplexen solcher Stickstoff-Donor-Liganden ist in der chemischen Literatur gut beschrieben. Die typische Synthese besteht aus Mischen und gegebenenfalls aus Erhitzen einer geeigneten Metallchlorid-Lösung in Gegenwart des gewünschten Stickstoff-Donor-Liganden. Gemischte Ligandenkomplexe werden normalerweise durch Erhitzen des Metallchlorids in Gegenwart einer Mischung der gewünschten Liganden im gewünschten Verhältnis hergestellt. Die resultierenden Produkte kommen normalerweise in einer statistischen Verteilung vor und können mit Hilfe von Verfahren nach dem Stand der Technik isoliert werden. Alternativ können die Chloridionen in einem Stufenprozess durch die ausgewählten Liganden ersetzt werden, wobei in einer kontrollierten Synthese das gewünschte Isomer hergestellt werden kann. Ebenso kann die Benutzung eines Liganden, der mehr als eine Metallbindungsstelle hat, in einem Polymetallkomplex resultieren (z.B. Verbindung 5).

[0043] Repräsentative Beispiele für die Herstellung von Metallkomplexe mit Stickstoff-Donor-Liganden können in Szmacinski et al., Biochemica et Biophysica Acta, 1383, 151 (1998); Castellano et al., Photochemistry and Photobiology, 67 (2), 179, 1998; Schwarz et al., J. Photochem. Photobiol., 112, 47, 1998; Bard et al., U.S. Patent Nr. 5,731,147 (1998) und Moucheron et al., J. Am. Chem. Soc., 118, 12834, 1996 gefunden werden.

[0044] Viele Liganden, die für den Gebrauch der vorliegenden Erfindung geeignet sind, sind kommerziell erhältlich. Wenn ein gewünschter Ligand nicht sofort erhältlich ist, wird er häufig leicht durch synthetische Modifikation aus einem Liganden vor der Komplexierung hergestellt, normalerweise durch Sulfonierung. Sulfonierung von heteroaromatischen Liganden kommt in Verfahren vor, die nach dem Stand der Technik gut bekannt sind, wobei normalerweise Schwefelsäure, rauchende Schwefelsäure oder Chlorsulfonsäure verwendet wird. Im Fall der Bipyridyl-Liganden ist eine direkte Sulfonierung nicht effektiv. Zum Beispiel werden sulfonierte Bipyridyle normalerweise durch Einführung von Thiolgruppen in Bipyridin gefolgt von einer Oxidation zur Sulfonsäure (z.B. J. Chem. Soc. Dalton Trans., 2247, 1985) hergestellt.

Anwendung

[0045] Die vorliegende Erfindung setzt die oben beschriebenen Metallkomplexe zur Färbung von Poly(aminosäuren) ein, gefolgt von einer Detektion der angefärbten Poly(aminosäuren) und optional deren Quantifizierung oder andere Analysen. Mit Poly(aminosäure) ist jedes Gemenge von mehreren Aminosäuren, die auch Homopolymere oder Heteropolymere von Aminosäuren einschließen und die Peptidbindungen besitzen, gemeint. Der hier verwendete Ausdruck Poly(aminosäuren) schließt Peptide und Proteine ein. Die Poly(aminosäuren) werden durch Kombination einer Probelösung, welche die Polyaminosäure enthalten sollte, mit einer Färbelösung, die einen oder mehrere der oben beschriebenen Metallkomplexe enthält, gefärbt; wobei man eine detektierbare kolorimetrische oder lumineszente optische Reaktion auf deren Bestrahlung erhält oder wobei der Metallkomplex eine detektierbare intrinsische Radioaktivität besitzt. Zusätzliche Schritte sind optional und werden unabhängig voneinander in jeder Kombination angewendet, um das Gel, bevor nach oder während des Färbens, für eine Trennung oder Reinigung der Poly(aminosäuren), eine Quantifizierung der Poly(aminosäuren), eine Identifikation einer speziellen Polyaminosäure oder Gruppe von Poly(aminosäuren), wie zum Beispiel im Falle eines Antikörpers oder Lectin, zur Verfügung zu stellen. Die Methode der vorliegenden Erfindung ist sowohl allgemein als auch im Besonderen anwendbar, um viele Aspekte auf dem Gebiet von Proteomics durchzuführen, das heißt, auf dem Gebiet der Bestimmung eines genauen Profils für die Proteinmenge, Struktur und Aktivität des Proteins in einer gegebenen Zelle oder einer Gewebeprobe.

[0046] Ohne dass dies theoretisch erklärbar ist, wird vermutet, dass die Sulfonatreste der erfindungsgemäßen Metallkomplexe elektrostatisch mit aliphatischen Aminen, die in Poly(aminosäuren) vorkommen, assoziiert sind, die normalerweise bei oder unter physiologischem pH protoniert und positiv geladen sind. Deshalb sind die Formulierungen und das Verfahren der Erfindung nützlich für die Detektion und Quantifizierung von anderen Substanzen, die primäre Amine besitzen, wie z.B. Lipopolysaccharide. Metallkomplexe, die eine positive Gesamtladung besitzen sind nicht gewünscht oder ungeeignet für das Einfärben von Poly(aminosäuren) und sind nicht in den Schutzzumfang der verwendeten Materialien, die für die vorliegende Erfindung geeignet sind,

eingeschlossen.

[0047] Normalerweise wird die vorliegende Erfindung dafür benutzt, um Poly(aminosäuren) zu detektieren, wobei eine Probemischung, die eine Polyaminosäure enthalten sollte, mit der Färbemischung, die einen oder mehrere Metallkomplexe der Erfindung enthält, kombiniert wird, um eine kombinierte Mischung zu erhalten. Die kombinierte Mischung wird dann für eine ausreichende Zeit inkubiert, damit der Metallkomplex der Färbelösung mit der in der Probemischung vorhandenen Polyaminosäure assoziieren kann. Die resultierende gefärbte Polyaminosäure wird dann mit einer Wellenlänge bestrahlt, bei der der ausgewählte Metallkomplex angeregt wird und die folgende optische Antwort detektiert wird.

Probemischung

[0048] Die Probemischung enthält Poly(aminosäuren) oder es wird vermutet, dass sie Poly(aminosäuren) enthält. Die Probemischung umfasst weiterhin optional eine wässrige Lösung, normalerweise mit Wasser (z.B. für reine Proteine) oder einem wässrigen Puffersystem bereitet oder wird mit einer wässrigen Lösung, im Falle einer Markierung, kombiniert. Wenn die wässrige Lösung zusätzlich Lösungsmittel neben Wasser enthält, dann ist Wasser jedoch das vorwiegende Lösungsmittel.

[0049] Üblicherweise ist die Probemischung auf einem Feststoff oder auf einer halbfesten Matrix aufgebracht. In einer Ausführungsform umfasst der Feststoff oder die halb feste Matrix eine Membran, wie zum Beispiel eine Filtermembran. In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Matrix ein Elektrophoresemedium, wie z.B. Polyacrylamidgel, Agarose-Gel, eine lineare Polyacrylamid-Lösung, Polyvinylalkohol-Gel oder einen kapillaren Elektrophoresepuffer. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist der Feststoff oder die halb feste Matrix eine Membran, wie z.B. eine Nitrocellulosemembran oder eine Polvinylidendifluorid-Membran, wobei die Poly(aminosäuren) durch Blotting, Spotten oder andere Anwendungsmethoden auf die Membran immobilisiert worden sind.

[0050] Die Poly(aminosäuren), die für diese Methode geeignet sind, umfassen sowohl, synthetische als natürlich vorkommende Poly(aminosäuren), die natürliche und unnatürliche Aminosäuren haben können. Die Poly(aminosäuren) der vorliegenden Erfindung schließen Peptide und Proteine ein. Poly(aminosäuren), die markiert und nach der vorliegenden Methode analysiert worden sind, beinhalten nicht-peptidische Regionen (kovalent oder nicht-kovalent), schließen Lipide (Lipopeptide und Lipoproteine), Phosphate (Phosphopeptide und Phosphoproteine), und/oder Kohlenhydratregionen (Glycopeptide und Glycoproteine) ein oder beinhalten Metallchelate oder andere prosthetische Gruppen oder nicht-Standard Seitenketten oder es sind Multi-Untereinheiten-Komplexe oder beinhalten andere organische oder biologische Substanzen, wie z.B. Nukleinsäuren. Die Poly(aminosäuren) sind optional relativ homogene oder heterogene Mischungen von Poly(aminosäuren). In einer Ausführung der Erfindung enthalten die Poly(aminosäuren) wenigstens eine basische Aminosäure, wie z.B. Lysin, Arginin oder Histidin. In einer anderen Ausführung sind die Poly(aminosäuren) Enzyme, Antikörper, Transkriptionsfaktoren, sekretierte Proteine, strukturelle Proteine, Kernproteine, Bindungsfaktoren oder Kombinationen davon. In noch einer weiteren Ausführung auf die Erfindung umfassen die Poly(aminosäuren) das Proteom einer Zelle.

[0051] Die Poly(aminosäuren) in der Probemischung sind optional kovalent oder nicht-kovalent an einen Feststoff oder an eine halb feste Oberfläche gebunden, wie zum Beispiel Glasseide, Multi-Well-Plates (wie z.B. 96-well-plate), Plastic Pin, Polymermembranen, Festbett, Halbleitermaterial, oder sie sind ungebunden. Das Färben einer Poly(aminosäuren), die an einen Analyten auf festem Material gebunden ist, zeigt das Vorhandensein des Analyten genauso gut an wie auch die Polyaminosäure.

[0052] Die Poly(aminosäuren) können aus einer Vielzahl von Quellen gewonnen werden. Diese Quellen schließen biologische Fermentationsmedien und automatische Proteinsynthesizer, so wie auch prokaryontische Zellen, eukaryontische Zellen, Viruspartikel, Gewebe und biologische Flüssigkeiten ein. Geeignete biologische Flüssigkeiten schließen Urin, Cerebrospinalflüssigkeit, Blut, Lymphe, Interstitiumflüssigkeit, Zellextrakte, Schleim, Spucke, Auswurf, Stuhl, physiologische oder Zellsekrete oder andere ähnliche Flüssigkeiten ein, sind aber auf diese nicht beschränkt. In einer Ausführung umfassen die Poly(aminosäuren) das Proteom einer tierischen Zelle, normalerweise einer Säugerzelle.

[0053] Von der Quelle der Probemischung abhängig, enthält diese optional weitere einzelne biologische Bestandteile außer Poly(aminosäuren), was andere Poly(aminosäuren) als die gewünschten einschließt, so wie Aminosäuren, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate und Lipide, welche während vor oder nach dem Färben oder auch gar nicht, entfernt werden können. In einer Ausführung der Erfindung werden im Laufe der Methode die

Poly(aminosäuren) in der Probemischung über ihre Möbilität (elektrophoretisches Gel oder Kapillargel), über ihre Größe (Zentrifugation, Pelleting oder Dichtegradient) oder über ihre Bindungsaffinität (z.B. Filtermembran oder Affinitätschromatographie) von einander oder von anderen Bestandteilen getrennt. In einer weiteren Ausführung der Erfindung umfasst die Probemischung entwicklungsfähige und nicht entwicklungsfähige Zellen, Organellen, wie zum Beispiel Zellkern oder Mitochondrien oder eine Mischung davon. In einer anderen Ausführung der Erfindung umfasst die Probemischung Gewebe, Gewebeschnitte, Gewebeabstriche, ganze Organe oder Organismen. In noch einer anderen Ausführung der Erfindung werden die Komponenten der Probemischung physisch voneinander getrennt, bevor oder während mit der Färbemischung kombiniert wird, was eine Trennung über Durchflusszytometrie, elektrophoretische oder mikrofluide Methoden einschließt, jedoch auf nicht diese Verfahren limitiert ist. Falls die Komponenten der Probemischung Zellen enthalten, werden die Zellen optional getrennt, basierend auf ihrer Fähigkeit einer detektierbare optische Antwort zu geben, was dann mit der Entwicklungsfähigkeit der Zelle korreliert ist (Beispiel 23).

[0054] Die Poly(aminosäuren) sind optional unmodifiziert oder wurden mit einem Reagenz oder einer molekularen Zusammensetzung behandelt, um die Möbilität der Poly(aminosäuren) in einem Elektrophoresegel zu erhöhen oder zu erniedrigen. Solche Reagenzien können die Poly(aminosäuren) mittels Komplexierens mit dem Protein (normalerweise um die Migration zu erniedrigen), durch Spaltung von ausgewählten Peptidbindungen (normalerweise um die Migration der erhaltenen Fragmente zu erniedrigen), durch Änderung der Ladung (z.B. durch Acylierung, Phosphorylierung oder Dephosphorylierung) oder durch kovalentes Anbinden eines Konstituenten, wie es z.B. bei einer Glykolisierung auftritt, verändern. Die Gegenwart oder Interaktion solch eines Reagenzes in der Probemischung wird mit einer Änderung der elektrophoretischen Möbilität der behandelten Poly(aminosäure) relativ zur unbehandelten Poly(aminosäure), die die selbe Originalzusammensetzung besitzt, detektiert, so dass die Verteilung der Poly(aminosäure) die Gegenwart eines anderen Analyten anzeigt.

[0055] Vorzugsweise haben die Poly(aminosäuren) in der Probemischung ein Molekulargewicht, das größer als ungefähr 500 Dalton ist. Bevorzugter haben die Poly(aminosäuren) ein Molekulargewicht von größer als 800 Dalton. Die vorliegenden Poly(aminosäuren) haben erforderlicher Weise dasselbe Molekulargewicht oder fallen in einen Molekulargewichtsbereich. In einer Ausführung der Erfindung bestehen die vorliegenden Poly(aminosäuren) aus einer Mischung verschiedener Molekulargewichte, die als Molekulargewichtsstandard benutzt werden. Üblicherweise enthält solch eine Mischung gleiche Massenanteile von Myosin, β -Galactosidase, Phosphorylase B, Rinderserumalbumin, Ovalbumin, Carboanhydrase, Trypsin-Inhibitor, Lysozym und Aprotinin. Die Metallkomplexe der vorliegenden Erfindung können ebenso niedermolekulare Peptide, Polypeptide und Proteine, wie z.B. Insulin, Aprotinin oder Neuropeptidasen einfärben. Die Metallkomplexe der Erfindung färben sehr kleine Peptide ein, sogar Peptide, die so klein wie ein 15-mer oder 7-mer sind (Beispiel 20). Die Färbung kleiner Peptide wird normalerweise verstärkt, wenn die Peptide eine oder mehrere basische Aminosäurereste enthalten.

[0056] In einer Ausführungsform der Erfindung werden getrennte Poly(aminosäuren) in Elektrophoresegeln mit der Färbemischung nachgefärbt oder werden auf eine Filtermembran übertragen, geblottet oder auf eine feste oder halb feste Matrix übertragen, bevor sie mit der Färbemischung kombiniert werden. Die vorliegende Methode ist für denaturierende und nicht-denaturierende Gele geeignet. Denaturierende Gele enthalten optional ein Detergens wie z.B. SDS (z.B. 0,05%–0,1% SDS) oder andere Alkylsulfonate. Üblicherweise werden Polyacrylamidgele oder Agarose-Gele für die Elektrophorese benutzt. Gebräuchliche Polyacrylamidgele, die im Allgemeinen ein Sammelgel besitzen, schließen Tris-Glycin-, Tris-Tricin-, Mini- oder Vollgröße-Gele ein, sind aber nicht auf diese beschränkt. Agarose-Gele enthalten modifizierte Agarose. Alternativ kann das Gel, ein Gel für die isoelektrische Fokussierung oder ein Gelstreifen sein. Neben Polyacrylamidgelen und Agarose-Gelen werden optional geeignete Elektrophoresegel hergestellt, wobei andere Polymere, wie zum Beispiel HYDROLINK verwendet werden.

[0057] Alternativ kann das Elektrophoresegel ein Gradientengel sein. Nützliche Elektrophoresegel für die vorliegende Erfindung werden entweder nach Standardtechniken hergestellt oder können kommerziell erworben werden. In einer anderen Ausführung der Erfindung wird das vorliegende Verfahren benutzt, um Poly(aminosäuren), die in einem Zweidimensionalen Gel vorliegen, zu detektieren. In einer Ausführung wird das Gel für Gel-Mobilitäts-Shift-Analysen benutzt, wobei ein Polyacrylamidgel oder Agarosegel in einen Puffer eingebracht wird, der optimiert wurde, um die spezifische Protein/Nukleinsäure-Interaktion zu bewahren. In jeder Ausführung wird die Färbelösung optional auf jeder Stufe der Elektrophorese mit der Probelösung kombiniert, die Farbstoffe werden jedoch bevorzugt nach der Elektrophorese-Trennung aufgetragen.

[0058] Viele herkömmliche Elektrophoresegel-Färbetechniken, wie zum Beispiel ammoniakalische Silberfär-

bung sind für pH-neutrale Gele, wie zum Beispiel die kommerziell erhältlichen vorgefertigten Gele, die Tris-Tricin und Tris-Bicin enthalten, wegen ihrer enorm hohen Hintergrundfärbung nicht geeignet. Im Gegensatz dazu färbt die vorliegende Methode pH-neutrale Gele mit hoher Empfindlichkeit. Sogar große Gele die einen Plastikrücken besitzen oder solche, die einen Verstärker benutzen (wie z.B. DURACRYL oder ACRYLAIDE) werden mit der vorliegenden Methode wirksam gefärbt.

[0059] Wenn sich die Probemischung auf einem Elektrophoresegel oder einer Blot-Membran befindet, sind die Poly(aminosäuren) normalerweise in einer Konzentration von 1 ng/Bande–4 µg/Bande zugegen.

[0060] In noch einer anderen Ausführungsform, wird die vorliegenden Erfindung dafür benutzt, um Poly(aminosäuren) zu detektieren, die selber mit dem Zielmolekül assoziiert sind; zum Beispiel ein biotinyliertes Zielmolekül, was später mit Hilfe von immunologischen Standardmethoden mit Streptavidin markiert wird. Das Streptavidin wird dann mit dem Metallkomplex der Erfindung eingefärbt. Eine Lumineszenz-Detektion von Streptavidin bedeutet eine Detektion und/oder Lokalisation des zu interessierenden Zielmoleküls. Gleichfalls kann ein Zielmolekül mit einem Polypeptid markiert werden, welches dann mit Hilfe den erfindungsgemäßen Metallkomplexe direkt detektiert werden kann. Der Gebrauch von zeitauflösenden Messungen ermöglicht sogar das Detektieren von kleinen Mengen des Zielmoleküls.

Färbemischung

[0061] Um eine Färbung der Polyaminosäure hervorzurufen, wird die Probemischung mit einer Färbemischung kombiniert. Eine Färbemischung wird normalerweise durch Auflösen des ausgewählten Metallkomplexes in einem Lösungsmittel, z.B. Wasser, DMSO, DMF oder Methanol, für gewöhnlich in einer Metallkomplex-Konzentration von 1–10 µM hergestellt. Die Komplexe besitzen im Allgemeinen gute Wasserlöslichkeit, besonders wenn 4–6 anionische Reste im Komplex vorhanden sind. Diese Komplexe müssen normalerweise vorher nicht in organischen Lösungsmitteln gelöst werden, bevor die wässrige Lösung hergestellt wird. Die konzentrierte Vorratslösung wird im Allgemeinen mit einer wässrigen Lösung gemäß dem Test, der durchgeführt werden soll, verdünnt. Färbelösungen können für Monate aufbewahrt werden, ohne an Signalintensität zu verlieren. Um Poly(aminosäuren) auf Gelen oder Membranen anzufärben, wird der Metallkomplex in einer Lösung, die Wasser enthält, aufgelöst, die optional weitere Komponenten, wie Säuren, Pufferbestandteile, anorganische Salze, polare organische Lösungsmitteln Antioxidantien und Ionen-Chelatoren, enthält.

[0062] Obwohl die vorliegende Färbemethode am nützlichsten ist, wenn sie in Verbindung mit einer Lumineszenz-Detektion verwendet wird, können einige Metallkomplexe, die in dieser Erfindung benutzt werden, im sichtbaren Bereich detektiert werden. Für eine Lumineszenz-Detektion umfasst die Färbelösung die Metallkomplexe in einer typischen Konzentration von mehr als 0,1 µM und weniger als 10 µM; vorzugsweise größer als ungefähr 0,50 µM und weniger als oder gleich ungefähr 5 µM; bevorzugter 1–3 µM. Wenn die Färbemethode der Erfindung für eine Lebendbestimmung von Zellen benutzt wird, hat der Metallkomplex eine Konzentration von ungefähr 1–5 µM, bevorzugt ungefähr 3 µM. In einer weiteren Ausführung hat der Metallkomplex eine Konzentration von ungefähr 1,5 µM. In einer anderen Ausführung hat der Metallkomplex eine Konzentration von ungefähr 5 µM.

[0063] Ein bestimmter Metallkomplex wird im Allgemeinen für einen speziellen Test ausgewählt und muss eines oder mehrere Kriterien erfüllen: Empfindlichkeit für Poly(aminosäuren) im Allgemeinen oder für eine spezielle Klasse davon, dynamischer Bereich, Lichtstabilität, Färbezeit und Unempfindlichkeit in Gegenwart von Nukleinsäuren. Vorzugsweise sind die Metallkomplexe der vorliegenden Erfindung fähig, 1–2 ng pro Bande Polyaminosäure oder weniger in Elektrophoresegelen zu detektieren.

[0064] Die erfindungsgemäßen Metallkomplexe färben Proteine sofort innerhalb eines weiten pH-Bereichs. Bevorzugt hat die Färbemischung einen pH-Wert von ungefähr 1 bis 10, bevorzugter hat die Färbemischung einen pH-Wert von 4 bis 9. Der pH der Färbelösung kann mit der Auswahl geeigneter saurer Komponenten oder Pufferagenzien kontrolliert werden.

[0065] Falls die Gegenwart einer sauren Komponente in der Färbelösung gewünscht wird, kann jede saure Komponente, die für Poly(aminosäuren) verträglich ist, benutzt werden. Typische saure Komponenten, die geeignet sind, schließen, ohne darauf beschränkt zu sein, folgendes ein: Essigsäure, Trichloressigsäure, Trifluoressigsäure, Perchlorsäure, Phosphorsäure oder Schwefelsäure. Die saure Komponente ist normalerweise in einer Konzentration von 1%–20% zugegen. Wenn die saure Komponente Essigsäure ist, dann liegt die typische Konzentration bei 5%–10%. Wenn die saure Komponente Trichloressigsäure ist, liegt die Konzentration typischerweise bei 7%–30%, vorzugsweise bei 10%–20% und weiter bevorzugt bei 12%–13%. Falls die saure

Komponente Perchlorsäure ist, liegt die Konzentration typischerweise bei 2%–5%. Wenn die saure Komponente Phosphorsäure ist, liegt die Konzentration typischerweise bei 1%–5%.

[0066] Der pH-Wert der Färbemischung wird durch Einbezug eines Pufferagens zusätzlich oder an Stelle zur sauren Komponente optional modifiziert. Im Besonderen konnte gezeigt werden, dass die Gegenwart eines Pufferagens die Färbung von Elektrophoresegelen verbessern kann, vorausgesetzt dass ein Alkohol und ein anorganisches Salz auch in der Formulierung vorhanden sind. Jedes Pufferagens, das für die Poly(aminosäuren) in der Probe verträglich ist, ist geeignet für eine Implementierung in die Färbelösung.

[0067] In einer Ausführung ist das Pufferagens eines der sogenannten „guten“ Puffer. „Gute“ Puffer schließen BES, BICIN, CAPS, EPPS, HEPES, MES, MOPS, PIPES, TAPS, TES, oder TRICIN ein. Andere nützliche Pufferagenzien schließen die Salze Formiat, Citrat, Acetat, 2-(N-Morpholin)ethansulfonsäure, Imidazol, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Tris-Hydroxymethyl-aminomethanacetat oder Tris-Hydroxymethyl-aminomethanhydrochlorid ein. In einer bevorzugten Ausführung ist das Pufferagens Natriumacetat. Das Pufferagens ist üblicherweise in einer Konzentration von 20 mM bis 500 mM zugegen, in einer anderen Ausführung in einer Konzentration von 50 mM bis 200 mM und in einer anderen Ausführung in einer Konzentration von ungefähr 100 mM.

[0068] Jedes anorganische Salz, was entsprechend löslich in der Formulierung ist, kann in Färbelösungen benutzt werden. Vorteilhafte anorganische Salze ergeben Färbeformulierungen, die ein niedriges Hintergrundrauschen in gefärbten Gelen zeigen. Typischerweise sollte das Ion des anorganischen Salzes wenigstens eine Mehrfachladung haben, wie z.B. ein Magnesiumsalz. Insbesondere nützliche und billige Salze schließen Ammoniumsulfat, Magnesiumchlorid, Zinkchlorid, Magnesiumsulfat und Magnesiumglucuronat ein, die in einer Konzentration von 1–50% in der Färbemischung vorkommen. In einer Ausführung ist das anorganische Salz Magnesiumchlorid. Magnesiumchlorid ist typischerweise in einer Konzentration von ungefähr 4–45% oder von ungefähr 5%–20% oder ungefähr von 6%–10% in der Färbelösung zugegen. In einer Ausführung hat das Magnesiumchlorid eine Konzentration von 8%.

[0069] Das Hinzufügen eines polaren organischen Lösungsmittels in die Färbemischung, typischerweise ein Alkohol, ist empfehlenswert. Normalerweise hat das organische Lösungsmittel 1–6 Kohlenstoffatome oder ist ein Diol oder Triol mit 2–6 Kohlenstoffatomen. Das polare organische Lösungsmittel, falls vorhanden, ist üblicherweise in der Färbemischung in einer Konzentration von 5–50% enthalten. Die Gegenwart eines polaren organischen Lösungsmittel ist besonders vorteilhaft, wenn man Natriumdodecylsulfat-überzogene Proteine anfärbt, was typischerweise der Fall ist, wenn man Poly(aminosäuren) anfärbt, die von SDS-Gelen mit einem Elektrophoretogramm übertragen wurden. Ohne der Theorie verpflichtet zu sein, scheint es so, dass die Gegenwart eines Alkohols, auf Grund der Entfernung von SDS vom Protein, das Lumineszenz-Färben von Poly(aminosäuren) verbessert. Allerdings können Nitrocellulosemembranen bei höheren Konzentrationen von Alkohol beschädigt werden (z.B. größer als 20%). Somit sollte darauf geachtet werden, die Lösungsmittelkonzentration in der Probenmischung auszuwählen, dass sie keine Beschädigung an Membranen verursachen.

[0070] Der Gebrauch von Färbelösungen, die Trichloressigsäure in Verbindung mit Ethanol oder Methanol enthalten resultiert in einer maßgeblichen säure-katalysierten Veresterung von Glutaminsäure, wie sich mit MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry) feststellen lässt. Diese unerwünschten Modifikationen von Proteinen, die durch die Färbemischung verursacht werden, werden durch Auswahl von weniger reaktiven Alkoholen in der Färbemischung verhindert. Der Gebrauch von niedermolekularen Diolen und Triolen als polare organische Lösungsmittel ist vorteilhaft, sowohl weil die Veresterung der Proteine in der Probe entfernt wird, als auch weil die niedermolekularen Diole und Triole grundlegend weniger entflammbar als Ethanol und Methanol sind. In einer Ausführung ist das organische Lösungsmittel ein Diol oder ein Triol mit 2–6 Kohlenstoffatomen. In einer Ausführung der Erfindung ist das polare organische Lösungsmittel Glycerin, Glycerolsäure oder ein Diol, der 2–6 Kohlenstoffatome hat. Weiter bevorzugt ist das polare organische Lösungsmittel 1,2-Ethandiol oder 1,2-Propandiol. Das polare organische Lösungsmittel liegt typischerweise in einer Konzentration von 5–50% vor. In einer Ausführung, die besonders nützlich für das Anfärben von isoelektrisch fokussierten Gelen ist, ist das organische Lösungsmittel ein Diol, das in einer Konzentration von 5–30% oder in einer Konzentration von 5–15% vorliegt. In einer anderen Ausführung, die besonders bevorzugt wird, für das Anfärben von Elektrophorese-Gelen ist das organische Lösungsmittel ein Diol, der in einer Konzentration von 30–40% oder in einer Konzentration von 33–36% vorliegt.

[0071] Das Anfärben von Poly(aminosäuren) wird optional durch das Hinzufügen eines Antioxidans oder eines Metallionen-Chelators verstärkt. Ausgewählte Ausführungen von Antioxidantien schließen Glucuronsäure, Ascorbinsäure und Zitronensäure ein. Ausgewählte Ausführungen von Metallionen-Chelatoren schließen

Ethylendiamindiessigsäure, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethylenglycol-bis- β -aminoethylethertetraessigsäure (EGTA), Zitronensäure, 1,2-Bis-(2-aminophenoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (BAPTA), 2-Carboxymethoxy-anilin-N,N-diessigsäure (APTRA) und verschiedene Kronenether ein. Zitronensäure kann entweder als Antioxidans oder als Chelatgruppe wirken und ist ein besonders nützliches Additiv der Färbemischung.

[0072] Allgemein gesagt wurden zwei Formulierungen der erfindungsgemäßen Färbemischung gefunden, die hocheffektive Färbereigenschaften aufweisen. Die erste ist der Färbeformulierung einer Standard-Coomassie Brillant Blue-Mischung ähnlich und enthält 0 bis 10% Säure, wie z.B. Essig- oder Ameisensäure und 0–40% Alkohol, wie z.B. Methanol, Ethanol oder einen Diol, der 2–6 Kohlenstoffatome hat. Diese Formulierung ist speziell für das Anfärben von Poly(aminosäuren) auf Membranen, so wie Dot-Blots, Slot-Blots oder Elektroblots ebenso wie für das Anfärben von Zellen auf Gewebeabdrücken mit einer kleinen Hintergrundfärbung geeignet. Die zweite bevorzugte Klasse von Formulierungen ist der ähnlich, die für Kolloid-Coomassie Blue-Färbungen von Gelen verwendet wird.

[0073] Falls die Metallkomplexe der Erfindung für Formulierungen hergestellt werden, die denen für eine Kolloid-Coomassie Blue-Färbung ähnlich sind, färben diese Poly(aminosäuren) in Polyacrylamidgelen mit einer stark reduzierten Hintergrundfärbung. Ein niedriges Lumineszenz-Hintergrundrauschen ist besonders für quantitative Messungen von Poly(aminosäuren)banden wichtig, da jegliches Entfärben einen Teil der Färbung auch dauerhaft aus den Polyamidbanden entfernen würde. Ausgewählte Färbeformulierungen und ihre Verwendung zum Färben von Elektrophoresegelen sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Färbeformulierung	Zusammensetzung (in Wasser)	Ergebnisse der Elektrophoresegel-Färbung
1	17% Magnesiumchlorid 2% Phosphorsäure 34% Methanol 1,5 µM Verbindung 2	Niedrige Hintergrundlumineszenz Gute Proteinfärbung
2	1,5 µM Verbindung 2	Hohe Hintergrundlumineszenz schlechte Proteinfärbung
3	17% Ammoniumsulfat 34% Methanol 1,5 µM Verbindung 2	Niedrige Hintergrundlumineszenz Gute Proteinfärbung
4	12,5% Trichloressigsäure 25% Ethanol 1,5 µM Verbindung 2	Niedrige Hintergrundlumineszenz Gute Proteinfärbung
5	17% Magnesiumchlorid 2% Phosphorsäure 1,5 µM Verbindung 2	Gefleckte Hintergrundlumineszenz Schwache Proteinfärbung
6	2% Phosphorsäure 34% Methanol 1,5 µM Verbindung 2	Hohe Hintergrundlumineszenz gute Proteinfärbung
7	34% Methanol 1,5 µM Verbindung 2	Hohe Hintergrundlumineszenz gute Proteinfärbung
8	17% Essigsäure 10% Methanol 1,5 µM Verbindung 2	Hohe Hintergrundlumineszenz gute Proteinfärbung
9	12,5% Trichloressigsäure 25% 1,2-Propandiol 1,5 µM Verbindung 2	Niedrige Hintergrundlumineszenz gute Proteinfärbung

[0074] Wie oben gezeigt, zeigen die Formulierungen 1 und 3 eine empfindliche Lumineszenz-Detektion von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen bei niedriger Hintergrundfärbung. Im Gegensatz zum Kolloid-Coomassie Blue-Färben gibt es keine Notwendigkeit für eine saure Lösungsumgebung. Formulierungen 6–8 sind Standard-Nicht-Kolloid-Formulierungen ähnlich und ergeben eine Färbung auf der Gel-Matrix, die, um optimale Resultate zu erhalten, einen Entfärbungsschritt des Gels beinhalten.

[0075] In einer anderen Formulierung (12,5% Trichloressigsäure, 25% Methanol) konnte ebenfalls ein geringes Hintergrundfärben von Proteinen erhalten werden. Das Herabsetzen der Alkoholkonzentration auf 10% oder 2,5% resultiert in einer Erhöhung der Hintergrundfärbung der Gel-Matrix. Das Ersetzen von Methanol durch 1,2-Propandiol hat keinen nachteiligen Einfluss auf die Färbung (Formulierungen 4 und 9). Das Weglassen von Trichloressigsäure führt allerdings, ähnlich wie in Formulierung 6, zu einer hohen Hintergrundfärbung. Deshalb enthalten die bevorzugten Färbemischungen sowohl eine saure Komponente als auch einen Alkohol oder einen Diol.

[0076] In einer Ausführungsform enthält die Färbemischung ungefähr 1,5 μM des erfindungsgemäßen Metallkomplexes, ungefähr 34% 1,2-Propandiol, ungefähr 8% Magnesiumchlorid und ungefähr 100 mM Natriumacetat bei pH 4. In einer anderen bevorzugten Ausführung, die Poly(aminosäuren) in isoelektrisch fokussierten Gelen besonders gut anfärbt, enthält die Färbemischung der Erfindung 1,5 μM Metallkomplex, ungefähr 12,5% Trichloressigsäure und ungefähr 25% 1,2-Propandiol. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform, die besonders gut Poly(aminosäuren) auf Dot-Blots und Elektroblobs anfärbt, enthält die Färbemischung 5 μM eines erfindungsgemäßen Metallkomplexes und ungefähr 100 mM Natriumacetat bei pH 4 und ungefähr 75 μM Zitronensäure. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform, die besonders für die Detektierung oder das Gegenfärben von Zellkulturen oder Gewebeschnitten geeignet ist, enthält die Färbemischung 1–5 μM eines erfindungsgemäßen Metallkomplexes und ungefähr 7% Essigsäure.

Kombinierte Mischung

[0077] Die Färbemischung wird mit der Probemischung in der Weise zusammengemischt, dass das der Kontakt zwischen Metallkomplex und jeder Polyaminosäure der kombinierten Mischung erleichtert wird. Ohne dies theoretisch belegen zu können, wird angenommen, dass die negativ geladenen Reste am erfindungsgemäßen Metallkomplex nicht-kovalent, durch elektrostatische Anziehung mit primären Aminen der Poly(aminosäuren) der Probemischung, welche generell bei pH-Werten unter 10 protoniert sind, interagieren.

[0078] Ein Entfärben der Gele ist normalerweise für eine Lumineszenz-Detektion von Proteinen nicht notwendig, wenn die erfindungsgemäßen Metallkomplexe benutzt werden, obwohl für bestimmte Färbemischungen, die Methanol/Essigsäure enthalten, eine Entfärbung die Detektion von Poly(aminosäuren) in Gelen normalerweise verbessert. Zum Beispiel kann die Hintergrundfärbung verringert werden, wenn das angefärbte Gel in einer vergleichbaren Formulierung, die eine Säure, einen Alkohol hat und den Metall-Färbekomplex nicht enthält, inkubiert wird. Diese Inkubation entfernt normalerweise den Farbstoff des Gelhintergrunds mit einem kleinen Verlust an Proteinfärbung. Die gefärbten Gele können nach dem Anfärben auch kurz gewaschen werden, um eine Übertragung des Metallkomplexes auf andere Oberflächen zu verhindern. Die Haltedauer der Färbung beträgt Monate, so dass die Gele ohne Signalverlust auch dann noch fotografiert werden können.

[0079] Elektrophoresegele, die nach Vorschrift dieser Erfindung hergestellt wurden, können nachfolgend auf Filterpapier oder zwischen zwei Plastikfolien (z.B. Cellophan) nach Standardmethoden getrocknet werden.

[0080] Wenn die erfindungsgemäße Färbemethode benutzt wird, um die Zellviabilität zu bestimmen, wird die Probemischung typischerweise mit der erfindungsgemäßen Färbemischung für 5–10 Minuten, vorzugsweise für 5–6 Minuten inkubiert. Wenn die erfindungsgemäße Färbemethode benutzt wird, um Gewebeabdrücke oder Zellen auf Objektträgern zu färben, dann wird die Probemischung typischerweise mit der erfindungsgemäßen Färbemischung für ungefähr 5–60 Minuten, vorzugsweise für 10–30 Minuten und am meisten bevorzugt für 15 Minuten inkubiert.

Zusätzliche Reagenzien

[0081] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung umfasst ferner optional Reagenzien, die gleichzeitig oder nacheinander mit der Probemischung, der Färbemischung oder der kombinierten Mischung kombiniert werden. Ein zusätzliches Reagenz ist optional ein Detektionsreagenz, das allgemein mit Poly(aminosäuren) vorkommt oder spezifisch die Detektion derselben erhöht, wie in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung. Alternativ kann das Zusatzreagenz nützlich für die Identifikation anderer Komponenten in der Probemischung sein, wie zum Beispiel die Anfärbung von Nukleinsäuren, Lipiden oder Kohlenhydraten. Oder das Zusatzreagenz ist ein Detektionsreagenz, was für die Interaktion mit einem spezifischen Teil der Probemischung vorgesehen ist, so z.B. die Untersuchung einer spezifischen Komponente der Probemischung, wobei ein räumliches Zusammentreffen des Metallkomplexes und des Zusatzreagenzes anzeigt, dass das Zusatzreagenz auch mit den Poly(aminosäuren) assoziiert ist.

[0082] Das Zusatzreagenz beinhaltet ein Gerät zum Erzeugen einer detektierbaren Antwort. Eine detektierbare Antwort meint, dass eine Veränderung eines Parameters in einem Testsystem entweder durch Beobachtung oder durch instrumentelle Messung wahrgenommen werden kann. Solche detektierbaren Antworten beinhalten eine Änderung in Färbung, Fluoreszenz, Reflexion, pH, Chemolumineszenz, Infrarotspektrum, magnetische Eigenschaften, Radioaktivität, Lichtstreuung, Röntgenstreuung oder die Fällung eines elektronenreichen Substrates. Geeignete Marker, um eine detektierbare Antwort zu erhalten, schließen ein im Sichtbaren absorbierender oder Fluoreszenzfarbstoff, ein chemolumineszierendes Reagenz, eine nach einer enzymatischen Behandlung im Sichtbaren absorbierende oder fluoreszierende Fällung (z.B. die Einwirkung von Meerrettich-Peroxidase auf Diaminobenzidin oder die enzymatische Einwirkung auf gelabeltes Tryramid), sichtbare oder fluoreszenzmarkierte Mikropartikel, ein Metall, wie z.B. kolloidales Gold, oder eine Silber-enthaltene Reagenz, was unter der Einwirkung von Licht freigesetzt wird (z.B. Käfigfluorophore, die durch Photolyse oder durch die Einwirkung von Licht auf Diaminobenzidin aktiviert werden) ein, welche aber auf diese Methoden nicht limitiert sind. Der detektierbare Marker des Zusatzreagenzes wird gleichzeitig oder hintereinander mit dem optischen Signal der erfindungsgemäßen Komplexe detektiert.

[0083] In einer Ausführungsform der Erfindung sind oder ist einer oder mehrere der oben beschriebenen Metallkomplexe einschließlich der oben beschriebenen bevorzugten Ausführungsformen das/die Zusatzreagenz(en). Die einzelnen Metallkomplexe können so ausgewählt werden, dass sie überlappende spektrale Eigenschaften besitzen, so dass ein Energietransfer zwischen den Polyaminosäure und den an die Aminosäuren assoziierten Metallkomplexe stattfindet, was zu markierten Poly(aminosäuren) und zu einer Stokes-Verschiebung führt. Alternativ kann der oder können die Farbstoffe mit dem Metallkomplex zusammen vorkommen, so dass die Markierung einer oder aller Poly(aminosäuren) zu einem Löscheffekt führt. Alternativ ist das Reagenz ein anderer Proteinfarbstoff (wie z.B. CBB oder Silberfärbung), so dass die Markierung der Poly(aminosäuren) durch gemeinsames Vorkommen mit dem Farbstoff erhöht wird.

[0084] Andere nützliche Reagenzien sind Nukleinsäure-Fluoreszenzfarbstoffe. Eine Vielzahl von geeigneten Nukleinsäure-Fluoreszenzfarbstoffe sind nach dem Stand der Technik bekannt und schließen Thiazolorange, Ethidium-Homodimer, Ethidiumbromid, Propidiumiodid, HOECHST 33258 und DAPI ein, sind aber nicht auf diese beschränkt. Andere nützliche Nukleinsäure-Fluoreszenzfarbstoffe sind in den internationalen Anmeldungen WO 93/06482, Dimers of Unsymmetrical Cyanine Dyes (veröffentlicht 1.4.93) oder WO 94/24213, Cyclic Substituted Unsymmetrical Cyanine Dyes (veröffentlicht 27.10.94); US-Patent Nr. 5321130 nach Yue et al., 1994 oder US-Patent Nr. 5410030 Dimers of Unsymmetrical Cyanine Dyes Containing Pyridinium Moieties nach Yue et al., 1995 beschrieben. Der Gebrauch von geeigneten Nukleinsäure-Fluoreszenzfarbstoffe in Verbindung mit den Farbstoffen der vorliegenden Erfindung erlaubt eine gleichzeitige oder sequentielle Beobachtung von Poly(aminosäuren) und Nukleinsäuren, wie z.B. DNA und RNA.

[0085] In einer Ausführungsform umfasst das Zusatzreagenz ein spezifisches Bindungspaar mit einem detektierbaren Marker. Entsprechende Bindungspaare sind in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: Repräsentative Bindungspaare

Enzym	Enzymsubstrat
Antigen	Antikörper
Biotin	Avidin (oder Streptavidin)
IgG*	Protein A oder Protein G
Kohlenhydrat	Lectin

*IgG ist ein Immunoglobulin

[0086] Das Zusatzreagenz kann in Verbindung mit Enzymkonjugaten, um die detektierbare Antwort des Reagenz zu lokalisieren, verwendet werden. Enzym-vermittelnde Techniken haben den Vorteil, dass sie in vielen Anwendungen eingesetzt werden können. Allgemein gesagt, verwendet eine Enzym-vermittelnde Technik ein Enzym als Reagenz, welches an einen Teil eines spezifischen Bindungspaares oder einer Gruppe von spezifischen Bindungspaaren gekoppelt ist, um über den komplementären Teil oder der Gruppe von komplementären Teilen eine Detektion zu erreichen. Im einfachsten Fall werden nur Teile eines spezifischen Bindungspaares genutzt. Ein Teil ist der Analyt, z.B. eine Substanz von analytischem Interesse. Ein Enzym ist an den anderen (komplementären) Teil angeheftet, um ein komplementäres Konjugat zu bilden. Alternativ können mul-

tipler Bindungspaare hintereinander an den Analyten, das komplementäre Konjugat oder an beide angeheftet sein, was zu einer Serie von spezifischen Bindungspaaren, die zwischen Analyt und detektierbarem Enzym des komplementären Konjugats, das in den spezifischen Bindungskomplex eingefügt ist, führt.

[0087] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann ein nach den Methoden der Erfindung gefärbtes Elektrophoresegel abgebildet und danach mit einem Detektionsreagenz inkubiert werden, was zum Beispiel ein primärer Antikörper sein kann. Das resultierende immunologisch markierte Gel wird dann nach den Methoden der Erfindung angefärbt. Der erfindungsgemäße Metallkomplex wird dann mit dem Antikörper assoziiert und diesen wie andere Poly(aminosäuren) anfärben und dabei die Gesamtfärbung des Gels erhöhen. In dieser Ausführung könnte sogar ein nicht-markierter Antikörper für Immunomarkierungsexperimente verwendet werden, da die Markierung nicht wesentlich den Färbungsprozess behindert. Diese Methodik ist speziell für Hochdurchsatz-Abbildungsverfahren in automatisierten Workstations geeignet, um gefärbte Gelflecken, die eine erhöhte Intensität auf Grund der Markierung und Färbung besitzen, sehr schnell zu identifizieren. Das Anfärben von anderen Poly(aminosäuren)-Markern, zum Beispiel Actin, das benutzt wird, um Actin-bindende Proteine zu erkennen, kann sofort nach dieser Methode erfolgen.

[0088] Als Beispiel für eine Anwendung eines zusätzlichen detektierbaren Reagenzes, ist ein erhebliches Problem in der zweidimensionalen Gelelektrophorese ist der Abgleich des Zielproteins mit Antikörper- oder Lectin-basierten-Verfahren mit der Gesamtheit aller Proteine der Spezies. Bekannte Proteinfärbungen, wie z.B. Amidoschwarz und CBB-Färbung sind schwierig zu entfärben, was ein folgendes Immunofärben verhindert und auch allgemein schwierig in dieser Anwendung zu handhaben. Die Färbemethode der vorliegenden Erfindung stellt eine einfache Zwei-Farben-Lumineszenz-Detektion in 2-D-Elektrophoresegelen zur Verfügung. Als Beispiel sei 2-(5'-Chloro-2-phosphoryloxyphenyl)-6-chloro-4(3H)-chinazolin (US Patent Nr.: 5316906 nach Haugland et al., 1994) genannt, was ein fotostabiles, gelbgrün-fluoreszierendes Präzipitat, welches spektral komplementär zu den Ruthenium(II)-Komplexen der vorliegenden Erfindung ist, offenbart. Der Gebrauch von alkalischen Phosphatase-konjugierten Antikörpern um Zielproteine bezüglich Verbindung 1 zu detektieren, erlaubt z.B. die Visualisierung von Proteinen in Einzelgelen oder auf Elektrobots. Die passende Wahl der Emissionsfilter erlaubt eine spektrale Trennung der Signale von Zielprotein und Gesamtproteinprofil. Es ist möglich, Fluorophore für die Detektion von spezifischen Proteinklassen auszuwählen, wie zum Beispiel Glycoproteine, Lipoproteine oder Phosphoproteine, welche für einen Gebrauch mit den erfindungsgemäßen Metallkomplexen spektroskopisch gut ausgestattet sind.

Bestrahlung und Beobachtung

[0089] Wenn in den erfindungsgemäßen Metallkomplex ein radioaktives Metallion (z.B. ein α - oder β -Strahler) eingelagert ist, kann die Gegenwart des Metallkomplexes in der kombinierten Mischung optional radiographisch detektiert werden. Typischerweise wird die Radioaktivität mit Film, Phosphor-Speicherplatten oder Mikroarray-Detektoren aufgezeichnet.

[0090] Der Metallkomplex ist normalerweise auf Grund seiner intrinsischen Lumineszenz detektierbar. Nach der Zugabe des Metallkomplexes zur Probemischung, wird diese von einer Lichtquelle bestrahlt, welche die gefärbte Probemischung anregen kann. Normalerweise sollte die Lichtquelle Licht emittieren, das bei oder nahe der Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Metallkomplexes liegt, wie zum Beispiel von einer Lampe, die ultraviolettes oder sichtbares Licht emittiert, einer Dampfampe, einer Fluoreszenzbirne oder sogar einer weißglühende Birne. Üblicherweise erfolgt die Anregung des Metallkomplexes bei 250–370 nm, während die Anregung im sichtbaren Bereich bei 450–540 nm liegt. Vorzugsweise wird die Probemischung bei einer Wellenlänge angeregt, die innerhalb 20 nm des Absorptionsmaximums des Metallkomplexes liegt. Obwohl die Anregung mit einer Quelle, die nahe am Absorptionsmaximum liegt in einer höheren Intensität resultiert, kann kommerziell erhältliche Ausrüstung für die Anregung von Fluoreszenz-Proben dazu verwendet werden, um die angefärbten Flecken der vorliegenden Erfindung anzuregen. Die ausgewählte Ausrüstung, die brauchbar ist, um Metallkomplexe zu bestrahlen, schließt Ultraviolett-Transilluminatoren, Ultraviolett-Epiilluminatoren, tragbare UV-Lampen, Quecksilberdampfampfen, Xenonlampen, Argon-Ionenlaser und Nd-YAG-Laser ein. Diese Bestrahlungsquellen sind optional in Laserscannern, Fluoreszenz-Mikroplattenlesegeräten, Standard- oder Mikrofluorometern Mikroskopen, Durchflusscytometern, Gellesern oder chromatographischen Detektoren enthalten sind aber auf diese nicht limitiert.

[0091] Da die Metallkomplexe der vorliegenden Erfindung eine Langzeit-Fluoreszenz besitzen, kann eine Fluoreszenz nach noch mehr als 100 Nanosekunden nach der Anregung und sogar nach mehr als 10 Mikrosekunden nach der Anregung (siehe Beispiel 4) beobachtet werden. Diese „zeit-aufgelöste“ Lumineszenz eliminiert alle Quellen von Hintergrundfluoreszenz, welche normalerweise kurzlebig sind. Diese Eigenschaft ist

nützlich, wenn die Proben eine intrinsische Fluoreszenz besitzen, Fluoreszenzverunreinigungen oder Reagenzien enthalten, die eine spontane Fluoreszenz emittieren.

[0092] Einige Übergangsmetallkomplexe, die Ruthenium(II)-Komplexe mit einschließen, zeigen ein Lumineszenz-Löschen in Gegenwart von Sauerstoff. Ohne der Theorie verpflichtet zu sein, scheint eine enge Assoziation der erfindungsgemäßen Metallkomplexe mit den Poly(aminosäuren) die Metallionen der vorliegenden Erfindung von einer Löschung durch Sauerstoff abzuschirmen, was in einer helleren Lumineszenz resultiert. Der Ausschluss von Sauerstoff aus der kombinierten Mischung kann in einer erhöhten Hintergrundfluoreszenz resultieren, da die nicht an Poly(aminosäuren) gebundenen erfindungsgemäßen Metallkomplexe ungelöscht bleiben. Umgekehrt kann die Zugabe von primären Aminen-enthaltenden Dendrimeren zu angefärbten Blots zu einer Erhöhung der Fluoreszenz führen, wahrscheinlich weil die Dendrimere die Metallionen zusätzlich von Sauerstoff abschirmen.

[0093] In einer anderen Ausführung der Erfindung kann die Gegenwart von Poly(aminosäuren) in der Probemischung mit Lumineszenzpolarisation gemessen werden. Die Technik der Fluoreszenzpolarisation bedingt das Anregen einer fluoreszenz- oder lumineszenz-markierten Probe in der Probemischung mit polarisiertem Licht und einer Messung der Polarisation der resultierenden Fluoreszenz. Wenn das markierte Molekül sehr groß ist und somit langsam rotiert (so wie zum Beispiel angefärbte Poly(aminosäuren)), dann ist die Änderung der Polarisation zwischen dem Anregungslicht und der resultierenden Fluoreszenz sehr klein. Wenn das markierte Molekül klein ist und schnell rotiert (wie z.B. die Metallkomplexe in Abwesenheit von Poly(aminosäuren)), ist die Änderung der Fluoreszenz groß. Für Fluoreszenzpolarisations-Experimente werden normalerweise homogene Lösungen benutzt.

[0094] In einer Ausführung der vorliegende Erfindung besitzt der erfindungsgemäße Metallkomplex ein Absorptionsmaximum zwischen 250 und 370 nm in der Ultraviolett-Region und/oder zwischen 440–550 nm im sichtbaren Bereich. In einer anderen Ausführung werden die erfindungsgemäßen Metallkomplexe so ausgewählt, dass der Absorptionsmaximum der Metallkomplexe mit den Wellenlängen der Laserquelle übereinstimmt. Typischerweise haben solcher Komplexe Absorptionsmaxima innerhalb 10 nm von 405 nm, 454 nm, 488 nm, 514 nm, 543 nm, 568 nm oder 590 nm. In einer anderen Ausführung werden die Komplexe der vorliegenden Erfindung effektiv in der ultravioletten Region angeregt, bevorzugter bei oder nahe 300 nm, 365 nm und/oder 254 nm.

[0095] Die detektierbare optische Antwort der Metallkomplexe auf eine Bestrahlung wird qualitativ oder optional quantitativ detektiert. Die detektierbare optische Antwort auf den Metallkomplex ist normalerweise eine Langzeit-Lumineszenz-Antwort.

[0096] Die optische Antwort wird normalerweise mit Methoden, die visuelle Inspektion, CCD-Kameras, Video-Kameras, photographische Filme oder der Gebrauch von gegenwärtig gebräuchlichen Methoden, wie zum Beispiel Laser-Scanner-Geräten, Fluorometern, Photodioden, Quantenzählern, Epifluoreszenz-Mikroskopen, Scanning-Mikroskopen, Durchflussscytometern, Fluoreszenzmikroplatten-Lesegeräten einschließen oder mit Methoden, die das Signal mittels Multiplier-Röhrchen verstärken, detektiert. Falls ein Film, wie zum Beispiel ein POLAROID-Film benutzt wird, wird die Empfindlichkeit des Signals gegenüber einer reinen visuellen Beobachtung erhöht. Der erfindungsgemäße Metallkomplex hat typischerweise eine Emission nahe 610–630 nm für Ruthenium-Komplexe, 650–670 nm für zweikernige Rutheniumkomplexe und 560–580 nm für Rhenium-Komplexe, obwohl ein geeigneter Stickstoffdonor-Ligand dazu benutzt werden kann, um die Absorptions- und Emissionswellenlängen etwas zu verändern. Die Empfindlichkeit der Detektion wird durch Techniken, die eine Trennung von Poly(aminosäuren) auf sehr dünnen Gelen oder in Mikrokapillarröhrchen erlauben, verbessert. Die Detektionsgrenzen können ebenfalls verbessert werden, falls das Medium mit stärkerem Licht, wie mit z.B. einem Laser angestrahlt, mit einem sensitiveren Detektor detektiert wird oder Hintergrundsignale über eine Detektion von verzögerter Lumineszenz zurückgedrängt werden. Die hohen Stokes-Verschiebungen der erfindungsgemäßen Metallkomplexe besitzen hervorragende Signal/Rausch-Verhältnisse mit einer Erniedrigung des Beitrags an gestreutem Licht und endogener Hintergrundfluoreszenz.

[0097] Die Lumineszenz wird optional für die Identifikation von Poly(aminosäuren) in der Testprobe benutzt. Alternativ kann die detektierbare optische Antwort quantifiziert werden und zur Konzentrationsbestimmung der Poly(aminosäuren) in der Testprobe benutzt werden. Eine Quantifizierung wird normalerweise durch einen Vergleich der optischen Antwort gegen einen Standard oder mit einer Kalibrierungskurve vorgenommen. Typischerweise wird die gemessene optische Antwort mit einer aus einer Standardverdünnung einer Polyaminosäure oder einer Mischung von Poly(aminosäuren) bekannter Konzentration in einem Elektrophoresegel oder einer Membran verglichen. Allgemein gesagt, muss immer dann einer Standardkurve benutzt werden, wenn

eine genaue Messung gewünscht wird. Alternativ kann eine Standardkurve durch Vergleich mit einem Referenzfarbstoff oder gefärbten Partikel, das vorher gegen einen mit Metallkomplexen angefärbten Poly(aminosäuren)-Standard gemessen wurde, erhalten werden.

[0098] Angefärbte Elektrophoresegele werden dazu verwendet, um die Zusammensetzung von komplexen Probemischungen zu analysieren und zusätzlich die relative Menge einer bestimmten Poly(aminosäure) in solchen Mischungen zu bestimmen. Gefärbte Gele werden ebenfalls dazu benutzt, um die Reinheit der isolierten Proteine abzuschätzen und den Grad der proteolytischen Degradation von Poly(aminosäuren) in der Testmischung zu bestimmen. Zusätzlich wird die elektrophoretische Mobilität optional dazu benutzt, um die Menge an uncharakterisierten Poly(aminosäuren) zu erhalten und um die Zusammensetzung der Untereinheiten in Multi-Untereinheiten-Proteinen zu analysieren, sowie die Stöchiometrie der gebundenen Untereinheiten in solchen Proteinen zu bestimmen. Im Fall der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wird die elektrophoretische Mobilität dazu benutzt, um die Netto-Molekülladung der Poly(aminosäuren) zu messen.

[0099] Der Gebrauch der erfindungsgemäßen Komplexe stellte eine höhere Empfindlichkeit der Poly(aminosäuren)-Detektion zur Verfügung als andere vergleichbare Elektrophoresegefärbungen und kann mit Anregung durch ultraviolette Strahlung oder mit Anregung durch sichtbares Licht benutzt werden. In einer Ausführung der Erfindung kann die vorliegende Methode in automatisierten Elektrophoresemethoden eingesetzt werden. Benutzt man die vorliegende Methode erlaubt die helle Lumineszenz von sogar kleinen Mengen von Poly(aminosäuren) eine Detektion mit automatisierten Methoden. Weiterhin im Gegensatz zu vielen elektrophoretischen Gefärbungsmethoden beinhaltet die vorliegende Methode eine „Endpunkt-Färbung“. Das heißt, während ein Elektrophoresegel während einer Silberfärbung überfärbt werden kann, leiden Gele, die mit der vorliegenden Methode gefärbt wurden, nicht unter einer zu langen Einwirkung des Färbemittels und in einigen Formulationen ist sogar kein Entfärben nötig, was weiterhin eine Automatisierung erleichtert. Die Empfindlichkeit und die helle Lumineszenz der vorliegenden Methode erleichtert eine genaue Lokalisation von Poly(aminosäuren)banden oder -flecken mit automatisierten Systemen, was eine nachfolgende Übertragung und/oder Analyse erlaubt.

[0100] Eine Ausführung der Erfindung umfasst weiterhin die Lokalisation der Polyaminosäurebanden oder -flecken und die physische Entfernung der Banden oder Flecken gefolgt von einer Trennung der Poly(aminosäuren) in der Elektrophoresegelmatrix. In einer anderen Ausführung umfasst die Lokalisation der Poly(aminosäuren) die Ionisierung der Poly(aminosäuren) und Charakterisierung mit Massenspektroskopie (Beispiel 22) oder die Übertragung und eine folgende Analyse der Poly(aminosäuren) mit Edman-Abbau (Beispiel 21).

[0101] Die vorliegenden Metallkomplexe konnten demonstrieren, dass sie sich als Einzelfarbstoff zur Zellebestimmung in Verbindung mit Durchflusszytometrie oder Lumineszenz-Abbildungsverfahren eignen. Ohne der Theorie verpflichtet zu sein, scheint es, dass nichtentwicklungsfähige Zellen (die defekte Zellmembranen haben) eine größere Zugänglichkeit zu den Metallkomplexen über Amine in Zellproteinen besitzen, was sich in einer erhöhten Lumineszenz relativ gegenüber den gefärbten Zellen von entwicklungsfähigen Zellen (wie in Beispiel 20) zeigt.

[0102] Wegen der einfachen Benutzung der vorliegenden Metallkomplexe, sind diese besonders nützlich in einer Formulierung für ein Kit, das Poly(aminosäuren) zu färben vermag, was einen oder mehrere Metallkomplexe (bevorzugt in einer Stammlösung), Anweisungen für den Gebrauch zur Einfärbung oder Detektion von Poly(aminosäuren) und optional Poly(aminosäuren)-Standards und andere Komponenten (wie zum Beispiel Puffer oder Waschlösungen) enthält. In einer Ausführung kann das Kit der Erfindung eine wässrige Stammlösung eines erfindungsgemäßen Metallkomplexes umfassen und eine oder mehrere zusätzliche Kit-Komponenten.

[0103] Die zusätzlichen Kit-Komponenten schließen optional Säuren, Pufferagenzien, anorganische Salze, polare Lösungsmittel, Antioxidantien oder Metallchelatoren ein. Die zusätzlichen Kit-Komponenten können als reine Zusammensetzungen oder als wässrige Lösungen, die eine oder mehrere zusätzliche Kit-Komponenten enthalten zugegen sein. Jede oder alle Kit-Komponenten umfassen weiterhin Puffer. Wenn die Kit-Komponente einer Säure ist, kann das optional Phosphorsäure, Essigsäure oder Trichloressigsäure sein. Wenn die optionale Kit-Komponente ein polares Lösungsmittel ist, dann ist das typischerweise ein niedriger Alkohol, wie zum Beispiel Methanol oder Ethanol oder ein Diol, der 2–6 Kohlenstoffatome hat. Wenn die zusätzliche Kit-Komponente ein anorganisches Salz ist, dann ist dies normalerweise ein Ammonium- oder ein Magnesiumsalz.

[0104] Die unten stehenden Beispiele veranschaulichen die Anwendungen dieser Erfindung. Sie sollen nicht als Einschränkung verstanden werden oder den gesamten Schutzbereich der Erfindung definieren.

BEISPIELE

Beispiel 1. Visualisierung von Proteinen auf Dot-Blot- oder Slot-Blot-Nitrocellulose-Membranen

[0105] Eine Protein-Verdünnungsreihe des zu interessierenden Proteins wurde in destilliertem und deionisiertem Wasser (dd-H₂O) oder in einer anderen geeigneten Lösung, wie z.B. 7% Essigsäure oder 20 mM Tris HCl, pH 6,8, 500 mM NaCl, bereitet. Für ein Dot-Blot-Experiment wurden 1–5 µL Volumen der Proteinprobe auf eine Nitrocellulose-Membrane mit einer Porengröße von 0,4 µm mit einer Pipette gegeben. Ein Slot-Blot wurde mit einem Bio-Dot SF-Vakuum-Apparat (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) durchgeführt. Für Slot-Blotting-Experimente wurden Membranen mit 100 µL/Well dd-H₂O rehydratisiert, die Proben auf die Membranen gegeben (200 µL/Well) und die Wells zweimal mit 600 µL 7% Essigsäure/10% Methanol und zweimal mit Methanol 600 µL dd-H₂O gespült. Nach dem Dot-Blot- oder Slot-Blot-Experiment wurden die Membran getrocknet. Die Membran wurde 4 Mal für jeweils 5 Minuten inkubiert, wobei das dd-H₂O jedes Mal gewechselt wurde. Die Membran wurde vollständig in eine Lösung aus 7% Essigsäure, 10% Methanol und 0,5 µM Verbindung 3 für 15–30 Minuten getaucht. Die Membran wurde 4–6 Mal für jeweils eine Minute in dd-H₂O gewaschen, um den Überschuss an Farbstoff von der Membran zu waschen. Die Membran wurde getrocknet und dann mit einer reflektiven oder transmittiven 300 nm-UV-Quelle betrachtet. Die zu erkennenden Proteine erscheinen als rot bis orangefarbene Lumineszenzbanden auf einem schwach rosafarbenen bis blaufarbenen Hintergrund. Im Vergleich mit der Anfärbung von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen mit Coomassie Blue nach Standard-Methoden, dauert es länger, um die Proteine angemessen zu beobachten, die Membran in 7% Essigsäure/10% Methanol zu entfärben.

Beispiel 2. Visualisierung von Proteinen auf Elektroblob-Nitrocellulose-Membranen

[0106] Die zu interessierenden Proteine wurden mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt und auf eine Nitrocellulosemembran gemäß Standardmethoden übertragen. Die Membran wurde getrocknet und in 7% Essigsäure, 10% Methanol, 0,5 µM Verbindung 4 angefärbt, wie in Beispiel 1 für Slot-Blot-Proteine beschrieben. Die Membran wurde getrocknet und dann mittels einer reflektiven oder transmittiven 300 nm-UV-Quelle betrachtet. Diese Methode ist ebenfalls für Polyvinylidendifluoridmembranen geeignet, so lange die Membran vor dem Elektroblob-Experiment und vor dem Färben mit Methanol und anderen geeigneten organischen Lösungsmitteln rehydratisiert wird. Die Proteine erscheinen als rote bis orangefarbene Lumineszenzbanden auf einem schwach rosafarbenen bis blaufarbenen Hintergrund. Vergleicht man die Färbemethode mit anderen Elektroblob-Methoden, hat Verbindung 4 einige Vorteile im Immunoblot-Experiment hinsichtlich Empfindlichkeit und Verträglichkeit (siehe Tabelle 3).

Tabelle: Vergleich der verschiedenen Färbemethoden für die Detektion von Proteinen nach einem Elektrolot

Färbung	Empfindlichkeit (ng/Bande)	Gefärbte Membranen	Reversibel?	Immunoblotting?	Edman-Abbau	Massenspektrometrie
Kolloidales Gold	2-4	PVDF, Nitrocellulose	Nein	Nein	Nein	Nein
Verbindung 1	2-8	PVDF, Nitrocellulose	Nein	Ja	Ja	Ja
India Ink	4-8	PVDF, Nitrocellulose	Nein	Nein	Nein	Nein
CBB R-250	10-30	PVDF, Nitrocellulose	Nein	Nein	Ja	Ja
SYPRO® Rose-Farbstoff	15-30	PVDF, Nitrocellulose	Ja	Ja	wurde nicht bestimmt	Ja
Kolloidales Silber	15-30	PVDF, Nitrocellulose	Nein	wurde nicht bestimmt	wurde nicht bestimmt	Ja
Amidschwarz	15-60	PVDF, Nitrocellulose	Nein	Nein	Ja	Ja
Ferrozin/eisenhaltig	15-100	PVDF, Nitrocellulose	Ja	Ja	Ja	Ja
Fast Green FC	15-100	PVDF, Nitrocellulose	Nein	Nein	Ja	Ja
Kongorot	30-60	PVDF, Nitrocellulose	Nein	wurde nicht bestimmt	wurde nicht bestimmt	wurde nicht bestimmt
Ponceau S	60-100	Nitrocellulose	Ja	Ja	Ja	Ja

- 1 zu bemerken ist, dass nur 50-70% des auf das Polyacrylamid gel gegebenen Proteins auf die Blot-Membran übertragen wurde. Empfindlichkeitswerte sind in der tatsächlichen Menge Protein im Gel vor dem Elektrotransfer angegeben.
- 2 Reversibel meint, dass die Färbung durch pH-Wert-Änderung oder Zugabe eines organischen Lösungsmittels, wie z.B. Methanol entfernt wird
- 3 Die Färbung beeinflusst nicht das folgende Immunoblot-Experiment mit Methoden nach dem Stand der Technik
- 4 Die Färbung beeinflusst nicht die folgende Charakterisierung mit Edman-Abbaus mit Methoden nach dem Stand der Technik
- 5 Die Färbung beeinflusst nicht die folgende Charakterisierung mittels Massenspektroskopie mit Methoden nach dem Stand der Technik

Beispiel 3. Visualisierung von Proteinen auf einer Polyvinylidendifluoridmembran ohne Rehydratisierung

[0107] Die zu interessierenden Proteine wurden mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt und auf eine Polyvinylidendifluoridmembran, die zunächst mit Methanol rehydratisiert wurde, gemäß Standardmethoden übertragen. Die Membran wurde luftgetrocknet. Da die Polyvinylidendifluoridmembran nicht in wässrigen Lösungen ohne vorherige Benutzung eines organischen Lösungsmittels wie z.B. Methanol rehydratisiert wurde, ist die Membran jetzt empfindlich gegenüber Nässe. Die Membran wird schwimmend und kopfüber in eine Lösung, bestehend aus 7% Essigsäure, 10% Methanol und 0,5 μM Verbindung 5 für 15–30 Minuten, gelegt. Die Membran wird schwimmend und kopfüber für 1 Minute in dd- H_2O inkubiert, um einen Überschuss von Farbstoff zu entfernen. Die Membran wird luftgetrocknet und in einer 300 nm-UV-Lichtbox angesehen. Die Hintergrundfärbung ist im Vergleich zu Beispiel 2 wegen der refraktorischen Natur der nicht-genässerten Membran stark reduziert. Die Proteine erscheinen als rote bis orangefarbene Lumineszenzbanden auf einem schwach rosafarbenen bis blaufarbenen Hintergrund.

Beispiel 4. Detektion von Proteinen in Filtrationsplatten mit Standard- oder zeitaufgelöster Lumineszenz

[0108] Vor einer Behandlung der Membranen mit Protein wurden diese in einzelne Wells einer 96-Well-MultiScreen-Filtrationsplatte von Millipore mit Methanol genässt und dann mit einer Lösung von 7% Essigsäure mit Hilfe einer Vacuum Manifold und den Anweisungen des Herstellers (Millipore Corporation, Bedford, MA) gespült. In jede Kavität wurden 0,2 bis 1000 ng/mm^2 Rinderserumalbumin ohne Anwendung eines Vakuums eingebracht. Die Platte wurde für 30–60 Minuten inkubiert bevor das Protein unter Anwendung eines Vakuums entfernt wurde. Die Filtrationsplatte wurde dann luftgetrocknet und die Wells wurden dann für 15–30 Minuten in 200 μL 7% Essigsäure, 10% Methanol und 1,5 μM Verbindung 1 ohne vorhergehende Rehydratisierung der Membran mit Methanol oder einem ähnlichen Lösungsmittel inkubiert. Die Farbstofflösung wurde mittels Pipettieren aus den Wells entfernt und 3–4 Mal mit 200 μL 7% Essigsäure gespült, um jeglichen ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Die Filtrationsplatte wurde danach mit einem Perkin-Elmer HTS 7000 Mikroplatten-Lesegerät mit einem Excitationsfilter von 485 nm und einem Emissionsfilter von 595 nm oder einem ähnlichem Lesegerät gelesen. Die Messungen wurden durch die Oberseite der Platte vorgenommen. Der Gain wurde auf 60 und 10 Blitze gesetzt und auf jedes Well angewendet. Die Integrationszeit wurde auf 20 μs gesetzt. Für zeitaufgelöste Lumineszenz wurden alle Instrumenteneinstellungen beibehalten, außer dass das Integrationssignal nach 10 μs nach einem Lichtblitz beginnt und dass die Integrationszeit auf 100 μs reduziert wurde. Die digitale Ausgabe der Werte entspricht der Lumineszenzintensität des Farbstoffsignals in jedem Well.

Beispiel 5. Visualisierung von gelösten Proteinen mit Carrier-Ampholyt-vermittelter isoelektrischer Fokussierungs-Gelelektrophorese

[0109] Isoelektrische Fokussierung (IEF) kann mit einer Vielzahl vorgefertigter und im Labor präparierter Gele durchgeführt werden, wobei verschiedene Chemikalien benutzt werden, um einen pH-Gradienten zu erzeugen. In diesem Fall laufen IEF-Fertiggele vertikal für 600 Voltstunden, wobei eine Mini-Protean II-Elektrophoresezelle (BioRad, Hercules, CA) nach Anweisungen des Herstellers benutzt wurde, außer dass 10 mM Phosphorsäure und 100 mM Natriumhydroxid als Anoden- und Kathodenpuffer benutzt wurden. Alternativ wurden Ampholine PAG-Platten horizontal für 1500 Voltstunden mittels einer Multiphor II-Elektrophoreseeinheit (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) nach den Anweisungen des Herstellers betrieben. In weiteren Alternativen wurden denaturierende 1 mm IEF-Stabgele mit einer 4% T, 2,6% C Polyacrylamidgel-Matrix, die 9 M Harnstoff, 2% Triton X-100 und 2% Trägerampholyte enthielt, gegossen. %T ist die Gesamtmonomerkonzentration (Acrylamid + Vernetzer) ausgedrückt in Gramm pro 100 mL und % C ist der Prozentsatz an Vernetzer (N,N'-Methylen-bis-acrylamid, N,N'-Diacryloylpiperazin oder andere geeignete Agenzien). Die Elektrophorese wurde auf einer Multiphor II-Elektrophoreseeinheit für 1500 Voltstunden mit 10 mM Phosphorsäure und 100 mM Natriumhydroxid als Anoden- und Kathodenpuffer durchgeführt. Vor dem Lumineszenzfärben der Gele wurde das Gel in 12,5% Trichloressigsäure für eine Stunde fixiert gefolgt von einer Inkubation in 12,5% Trichloressigsäure, 25% Ethanol und 1,5% Verbindung 1 für 15 Stunden (über Nacht). Die Gele wurden dann gewaschen, wobei zweimal das Wasser gewechselt wurde und jede Charge mit einer 300 nM UV-Lichtquelle angesehen wurden. Der Polyester-Abdeckfolie auf den Ampholin PAG-Platten wird normalerweise vom Gel während einer Inkubation in Wasser abgetrennt. Weil an dieser Folie oft noch Restfarbstoff gebunden ist, kann das Hintergrundfärben mit der Entfernung der Folie vom Gel reduziert werden. Die Proteine erscheinen als rote und orangefarbene Lumineszenzbanden auf einem klaren Hintergrund. Ein Vergleich der IEF-Gelfärbung mit Coomassie Blue, Silberfärbung und Verbindung 1 ist in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4

Markerprotein	Isoelektrischer Punkt	Empfindlichkeitsgrenze (ng/Bande)		
		Kolloid-Coomassie Blue	Silber	Verbindung 1
Amyloglucosidase	3,50	560-1390	7-17	7-17
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	4,55	1670-4160	190-460	60-150
β -Lactoglobulin A	5,20	560-1390	1670-4160	190-460
Rinder-Carboanhydrase B	5,85	1670-4160	190-460	60-150
Humane Carboanhydrase B	6,55	560-1390	1670-4160	60-150
Pferde-Myoglobin (saure Bande)	6,85	1670-4160	190-460	190-460
Pferde-Myoglobin (basische Bande)	7,35	60-150	1670-4160	60-150
Linsen-Lectin (saure Bande)	8,15	560-1390	190-460	60-150
Linsen-Lectin (mittlere Bande)	8,45	560-1390	190-460	190-460
Linsen-Lectin (basische Bande)	8,65	560-1390	190-460	60-150
Trypsinogen	9,30	1670-4160	560-1390	60-150

Beispiel 6. Visualisierung von gelösten Proteinen mit der immobilisierenden pH-Gradienten-Elektrophorese (IPG)

[0110] IPG Elektrophorese wird mit vorgefertigten pH 4–7 Immobiline Dry Plates (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Die Gele wurden in 2% Pharmalyte 3–10-Ampholyten in einer Reswelling-Kassette nach den Anweisungen des Herstellers (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) rehydratisiert. Die Elektrophorese wurde bei 10000 Voltstunden mit einer Multiphor II-Elektrophoreseeinheit horizontal durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in 12,5% Trichloressigsäure für eine Stunde inkubiert gefolgt von einer Inkubation in 12,5% Trichloressigsäure, 25% Ethanol und 1,5% Verbindung 4 für 15 Stunden (über Nacht). Die Gele wurden dann gewaschen, wobei zweimal das Wasser gewechselt wurde und jede Charge mit einer 300 nM UV-Lichtquelle angesehen wurden. Der Polyester-Rücken verbleibt normalerweise am derivatisierten Polyacrylamid.

[0111] Das Gel wird mit der Polyesterabdeckung nach oben unter UV-Lichtquelle platziert, um eine optimale Betrachtung der eingefärbten Proteinbanden zu erreichen. Die Proteine erscheinen als rote bis orangefarbene Lumineszenzbanden auf einem schwach rosafarbenen bis blaufarbenen Hintergrund.

Beispiel 7. Visualisierung von gelösten Proteinen mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (mit Entfärbung)

[0112] Die zu interessierenden Proteine wurden mit einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit einem 4% T, 2,6 C Sammelgel, pH 6,8 und einem 15% T, 2,6% C Trenngel pH 8,8 nach Standard-Prozedur getrennt. Das Gel wurde nacheinander mit 25% Trichloressigsäure für 20 Minuten und dann drei Mal mit 30% Methanol für jeweils 20 Minuten inkubiert und dann in 30% Methanol, 1,5 mM Verbindung 1 für 1–2 Stunden gefärbt. Eine Untersuchung des Gels mit einer tragbaren Midrange UV-Lichtquelle zeigte, dass das Gel vollständig gefärbt ist. Das Gel wurde nacheinander in eine Entfärbungslösung bestehend aus 30% Methanol und 7% Essigsäure übertragen und für weitere 4–6 Stunden inkubiert. An diesem Punkt wurde der Farbstoff von der Polyacryla-

mid-Matrix eluiert, verblieb aber selektiv an den Proteinen innerhalb der Matrix. Das Gel wurde mit einem UV 300 nm Transilluminator angeschaut. Die Proteine erscheinen als rote bis orangefarbene Lumineszenzbanden auf einem schwach rosafarbenen Hintergrund.

Beispiel 8. Visualisierung von gelösten Proteinen mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (ohne Entfärbung)

[0113] Die zu interessierenden Proteine wurden mit einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese bestehend aus einem 4% T, 2,6 C Sammelgel, pH 6,8 und einem 15% T, 2,6% C Trenngel pH 8,8 nach Standard-Prozedur getrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in 7% Ammoniumsulfat, 34% Methanol, 2% Phosphorsäure und 1,5 μ M Verbindung 2 für 2–15 Stunden inkubiert. Die Gele wurden in dd-H₂O für 10–15 Minuten gewaschen und unter einem UV 300 nm Transilluminator angeschaut. Die Proteine erscheinen als rote bis orangefarbene Lumineszenzbanden auf einem klaren Hintergrund. Verglichen mit Beispiel 7 ist dies die bevorzugte Färbemethode für Polyacrylamidgele, da jeder Entfärbungsschritt auch Farbstoff von den Proteinen löst und somit das Signal reduziert. Tabelle 5 vergleicht die Empfindlichkeit einiger gebräuchlicher Färbemethoden mit dem kolloidalen Rutheniumkomplex.

Tabelle 5

Detektionsreagenz	Empfindlichkeit (ng/Bande)
Kolloidaler Coomassie Blue-Farbstoff	8-16
Silberfärbung	2-4
SYPRO® Orange Dye	2-4
Verbindung 2	1-2

Beispiel 9. Visualisierung von Proteinen nach nicht-denaturierender Polyacrylamidgel-Elektrophorese

[0114] Proteine aus 3T3 Mausfibroblasten wurden in 0.2% Triton X-100 homogenisiert, mit Ultraschall (Probe Sonicator, 3 Impulse, 20% Leistung) zerrissen und für 2 Minuten bei 13000 \times g zu pelletierten Schwebstoffen zentrifugiert. Der Überstand wird auf 10% Glycerin und 80 mM Tris-HCl, pH 6,8 eingestellt. Ungefähr 100 μ g Protein wurden auf jede Bahn eines Polyacrylamidgels, das aus 4% T, 2,6% C Sammelgel, pH 6,8 und aus 7% T, 2,6 C Trenngel, pH 8,8 bestand, aufgetragen. Die Gele und Puffer wurden nach Standard-Prozeduren hergestellt, außer das Natriumdodecylsulfat und ein reduzierendes Agens (z.B. Dithiothreitol oder 2-Mercaptoethanol) weggelassen wurden. Die Elektrophorese wurde nach Standardvorschrift durchgeführt, wobei ein 25 mM Tris-, 192 mM Glycin-Elektrodenpuffer pH 8,8 benutzt wurde. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in 7% Ammoniumsulfat, 34% Methanol, 2% Phosphorsäure und 1,5 μ M Verbindung 1 für 1–15 Stunden inkubiert. Die Gele wurden für 10–15 Minuten in dd-H₂O gewaschen und unter einem 300 nm-UV-Transilluminator angesehen. Die Proteine erscheinen als rote bis orangefarbene Lumineszenzbanden auf einem klaren Hintergrund.

Beispiel 10. Visualisierung von Proteinen nach zweidimensionaler Gelelektrophorese

[0115] Eine 3T3 Mausfibroblasten-Zelllysate-Proteinmischung wurde in 8 M Harnstoff, 2% Triton X-100, 2% Carrier-Ampholyten und 100 mM Dithiothreitol, 0,1% Natriumdodecylsulfat und 12,5 mM Tris, pH 8,0 solubiliert. Ungefähr 50 μ g Protein wurden auf Isoelektrische Fokussierungsgele (1 mm Durchmesser, 20 cm Länge) aufgetragen, wobei die Gelmatrix aus 4% T, 2,6% C bestand und 9 M Harnstoff, 2% Triton X-100 und 2% Carrier-Ampholyten enthielt.

[0116] Die Gele wurden vertikal für 18000 Voltstunden mit 10 mM Phosphorsäure und 100 mM Natriumhydroxid als Anodenpuffer und Kathodenpuffer betrieben. Die isoelektrischen Fokussierungsgele wurden in 0,3 M Tris-Base, 0,075 M Tris-HCl, 3% SDS, 0,01% Bromphenolblau für 2 Minuten inkubiert. Die Gele wurden dann auf ein 1 mm dickes und 20 cm \times 20 cm großes, 12,5% T, 2,6% enthaltenes SDS-Polyacrylamidgel, was 375 mM Tris-Base, pH 8,8 enthielt, gelegt. Die anschließende Gelelektrophorese wurde nach Standard-Prozedur durchgeführt, bis auf die Benutzung eines 50 mM Tris, 384 mM Glycin, 4% Natriumdodecylsulfat, pH 8,8 Kathodenpuffers und eines 25 mM Tris, 192 Glycin, 2% Natriumdodecylsulfat, pH 8,8 Anodenpuffers. Nach der zweiten Dimension wurden die Gele in ungefähr 500 mL 34% Methanol und 2% Phosphorsäure für eine Stunde

inkubiert. Danach wurden die Gele noch für 15 Stunden in 12,5% Trichloressigsäure, 25% Methanol, 1,5 μM Verbindung 1 inkubiert. Die Gele wurden für 10–15 Minuten in dd-H₂O gewaschen und unter einem 300 nm-UV-Transilluminator angesehen. Die Proteine erscheinen als rote bis orangefarbene Lumineszenzbanden auf klarem Hintergrund.

Beispiel 11. Visualisierung von latenten Fingerabdrücken auf Festsubstraten

[0117] Ein Daumen oder Finger wurde fest auf einen trockenen Objektträger, eine Nitrocellulosemembran oder eine Polyvinylidendifluoridmembran (Substrate) gepresst. Das Substrat wurde dann mit 7% Essigsäure und 2,5 μM Verbindung 1 für 15–30 Minuten inkubiert, in dd-H₂O für 5 Minuten gelegt und luftgetrocknet. Die Substrate wurden dann mit einer tragbaren UVM 57-Midrange UV-302 nm-Lampe (UVP, Inc. Upland, CA) angeschaut. Die Fingerabdrücke erscheinen als rote bis orangefarbene Lumineszenzmuster auf einem sehr schwachen rosafarbenen Hintergrund.

Beispiel 12. Detektion von Proteinen in Gelen oder auf Membranen mit einem Laserangeregten Gelscanner

[0118] Proteine auf Membranen oder in Polyacrylamidgelen wurden, wie in den Beispielen 1–3 oder 5–10 entsprechend beschrieben, gefärbt. Das gefärbte Material wurde einem Laser-angeregten Gelscanner zugeführt, wie zum Beispiel Molecular Device FLUORIMAGER, Molecular Devices STORM (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) oder Hitachi FMBIO II (Hitachi, San Bruno, CA). Für den FLUORIMAGER-Scanner wurde die Anregung mit einer Argon-Laserquelle bei 488 nm vorgenommen und ein Emissionsfilter 610 \pm 15 nm, um das Signal zu sammeln, benutzt. Für den STORM-Scanner wurde der Blau-Fluoreszenz-Modus mit einer Anregung bei 450 \pm 30 nm benutzt und ein 520 nm Langpassfilter eingesetzt, um das Signal zu detektieren. Für das Hitachi FMBIO II Instrument wurde die Anregung über einen 532 nm Doppelfrequenz YAG-Laser erreicht und das Signal wurde mit 585, 605, 625 oder 650 nm Emissionsfiltern detektiert. Die Proteine erscheinen als weiße Banden auf hellgrauem bis weißen Hintergrund auf dem Computermonitor, je nach dem welcher Anzeigemodus benutzt wird. Die Instrumentensoftware gibt digitale Werte aus, die mit der Fluoreszenzintensität des Signals einer jeden Bande korrespondiert.

Beispiel 13. Detektion von Proteinen in Gelen mit Photographie

[0119] Proteine auf Membranen oder in Polyacrylamidgelen wurden, wie in den Beispielen 1–3 oder 5–10 entsprechend beschrieben, gefärbt. Das gefärbte Material wurde in einen 300 nm-Transilluminator gelegt. Die gefärbten Gele wurden mit einem Polaroid 667 Schwarzweißfilm und einem Kodak&Wratten-9-Gelatine-Filter fotografiert. Die Proteine erscheinen auf dem Polaroidphoto als weiße Banden auf grauem bis schwarzen Hintergrund.

Beispiel 14. Detektion von Proteinen mit einem CCD-Kamera-Scanner

[0120] Proteine auf Membranen oder in Polyacrylamidgelen wurden, wie in den Beispielen 1–3 oder 5–10 entsprechend beschrieben, gefärbt. Das gefärbte Material wurde in einen UV-Transilluminator einer CCD-Kamera-basierenden Workstation gelegt, wie zum Beispiel Boehringer-Mannheim Lumi-Imager (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), Genomic Solutions BiImage (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI) oder Bio-Rad Fluor-S-System (Bio-Rad, Hercules, CA). Alle Geräte wurden bei einer Anregung von ungefähr 300 nm betrieben. Mit dem Lumi-Imager und dem BiImage-System wurden Bandenpassemissionsfilter bei 600 \pm 30 nm benutzt, während für den Fluor-S ein 520 nm Langpassemissionsfilter eingesetzt wurde. Die Gelbilder wurden mit einer Standardsoftware, die vom Hersteller zur Verfügung gestellt wurde, aufgenommen. Die Proteine erscheinen, je nach ausgewähltem Modus, als weiße Banden auf einem grauen bis schwarzen oder als schwarze Banden auf einem hellgrauen bis weißen Hintergrund auf dem Computermonitor. Die Instrumentensoftware gibt digitale Werte aus, die mit der Fluoreszenzintensität des Signals einer jeden Bande korrespondiert.

Beispiel 15. Detektion von Proteinen mit einer blauen Fluoreszenz-Lichtquelle

[0121] Proteine auf Membranen oder in Polyacrylamidgelen wurden, wie in den Beispielen 1–3 oder 5–10 entsprechend beschrieben, gefärbt. Das gefärbte Material wurde in eine Blue Light Box gelegt, wie zum Beispiel DARK READER (Clare Chemical Research, Denver, CO), der mit einer blauen 9 Watt Fluoreszenzbirne ausgerüstet war (z.B. Sylvania DuLux CF9DS/Blue, Osram-Sylvania, Waltham, MA). Die Gele wurden mit diesem Instrument in einem dunklen Raum betrachtet. Das gefärbte Gel wurde auf den DARK READER gelegt und mit einer Bernsteinplastikfolie (mit dem Gerät mitgeliefert) abgedeckt. Die Proteine erscheinen als rote bis orangefarbene Banden auf dunklem Hintergrund.

Beispiel 16. Detektion von Gewebeabdrücken

[0122] Die Spitzen von grünen Zwiebeltrieben wurden so nach wie möglich am Ende abgeschnitten, um die Meristemen freizulegen. Die abgeschnittenen Pflanzenenden wurden leicht auf die Nitrocelluloseoberfläche einer Grace Bio-Labs ONCYTE Filmfolie (Grace BioLabs, Bend, OR) für 15 bis 120 Sekunden gedrückt. Die Folie wurde für eine Stunde luftgetrocknet und dann in einer Feuchtkammer mit 3,7% Paraformaldehyd in TBS (100 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, pH 7,5) fixiert. Die Folie wurde dann drei Mal für jeweils 15 Minuten mit TBS und dann zweimal mit dd-H₂O gewaschen. Die Folie wurde dann für 15 Minuten mit 5 mM Verbindung 1, 7% Essigsäure in einer Feuchtkammer gefärbt. Die Folie wurde hintereinander mit zweimal dd-H₂O gewaschen. Die Gewebeabdrücke wurden in einer 300 nm Standard-UV-Lichtbox mit einem Nikon Fluoreszenzmikroskop mit 480 +/- 30 nm Anregungsfiltern und 635 +/- 28 nm Emissionsfiltern betrachtet. Das Gewebe konnte leicht als rote bis orangefarbene Lumineszenzregion auf dunklem Hintergrund identifiziert werden.

Beispiel 17. Farbfixierte Säugerzellen

[0123] ROS 17.1 Osteosarcoma-Zellen (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA) wurden in Kulturschalen gezüchtet und in 3,7% Formaldehyd, 100 mM Tris-Base und 150 nM NaCl, pH 7,5 nach Standardvorschrift fixiert. Die fixierten Zellen wurden 3 Mal mit 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7.0 (PBS) gewaschen. Die Kulturschalen wurden mit 5 µM Verbindung 1 und 7% Essigsäure für 10 Minuten inkubiert und dann zweimal mit dd-H₂O gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Nikon Fluoreszenzmikroskop mit 480 +/- 30 nm Anregungsfiltern und 635 +/- 28 nm Emissionsfiltern betrachtet. Die Zellen erscheinen als rote bis orangefarbene Lumineszenzregionen auf dunklem Hintergrund. Der Farbstoff färbte die gesamte Zelle, schien sich jedoch im Nucleus zu konzentrieren und den Nucleolus auszuschließen. Eine Extrafärbung konnte in den Coiled Bodies beobachtet werden.

Beispiel 18. Verlust von DNA-Labelin in Poylacrylamidgelen

[0124] Eine Verdünnungsreihe von 250 Nanogramm bis 30,5 Picogramm an doppelsträngiger DNA des Molekulargewichtsmarkers IX (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) wurde erstellt, auf ein 5% T, 5% C Polyacrylamidgel gegeben und elektrophoretisch nach Standardvorschrift getrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 15 Stunden in 34% Methanol, 2% Phosphorsäure, 7% Ammoniumsulfat und 1,5 µM Verbindung 1 inkubiert. Um die DNA-Banden zu beobachten, wurden die Gele nachfolgend in ein 300 nm UV-Transilluminator gelegt. Es wurden keine Lumineszenzbanden beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die Färbemethode vorzugsweise für Proteine geeignet ist.

Beispiel 19. Visualisierung von Aminosäuren-Homo- und Heteropolymeren auf Nitrocellulose-Membranen

[0125] Es wurden Lösungen der Homopolymere Homo-Poly-L-Arginin, Asparagin, Histidin, Lysin, Aspartat, Glutamat, Alanin, Glycin, Isoleucin, Methionin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Prolin mit einer Konzentration von 1 µg/mL erstellt. Die Aminosäuren-Heteropolymere Polyglutamat, alanin, tyrosin), Polyglutamat, tyrosin), Poly(lysin, tyrosin), Polyglutamat, lysin, tyrosin) und Poly(arginin, tyrosin) wurden in der selben Weise wie die Homopolymere hergestellt. Alle Polymere wurden von Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) bezogen. 1–5 µL Volumen der Polymere wurden auf eine Nitrocellulosemembran appliziert und luftgetrocknet. Das Anfärben wurde nach Beispiel 1 mit einem erfindungsgemäßen Farbstoff durchgeführt. Es sei erwähnt, dass nur die ausgewählten Polymere mit dem Farbstoff angefärbt werden konnten, wie durch eine starke orangefarbene bis rote Lumineszenz demonstriert werden konnte. Es konnte beobachtet werden, dass der Farbstoff vorzugsweise mit den basische Aminosäuren (Histidin, Lysin oder Arginin) enthaltenden Polymeren reagiert. Es konnte eine schwache Reaktivität gegenüber Tryptophan und Tyrosin beobachtet werden.

Beispiel 20. Peptidanfärbung nach Trennung durch Dünnschichtchromatographie

[0126] Zwei Peptide, Kemptid (ein 7-mer) und Dinorphin A (ein 15-mer) wurden bis zur Endkonzentration von 1 mg/mL in Wasser gelöst. Ungefähr 1 Mikroliter der Peptidlösung wurden auf eine trockene Silica-Dünnschichtchromatographie-Platte getüpfelt. Die aufgetragenen Proteine wurden einer Dünnschichtchromatographie zugeführt und mit einem Gemisch aus 1-Butanol:Essigsäure:Pyridin:Wasser (37,5:7,5:25:30) nach Standardvorschriften eluiert. Nachdem die Lösungsmittelfront etwa zwei Drittel gelaufen war, wurde die Platte vom Lösungsmittel befreit und luftgetrocknet. Die Platte wurde dann in ein Gemisch aus 10% Methanol und 7% Essigsäure für 15 Minuten eingetaucht. Danach wurde die Platte in eine Lösung aus 5 µM Verbindung 1, 10% Methanol und 7% Essigsäure für 15 Minuten getaucht. Die Platte wurde mit 3 Chargen dd-H₂O gewaschen und luftgetrocknet. Die Platte wurde mit einer tragbaren 300 nm UV-Lichtquelle betrachtet. Die chromatographier-

ten Peptide erscheinen als rote bis orangefarbene Lumineszenz-Flecken auf einem sehr schwach rosafarbenen Hintergrund.

Beispiel 21. Edman-Sequenzierung von Proteinen nach Elektroblob auf Transfermembranen

[0127] Die zu interessierenden Proteine wurden einer Elektrophorese unterzogen und dann auf eine Polyvinylidendifluoridmembran übertragen und nach Beispiel 3 angefärbt. Nachdem die Zielproteine identifiziert worden waren, wurden die Banden mit einer scharfen Rasierklinge ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Banden wurden dann entweder direkt benutzt oder in 150 mM Tris, 8,8, 20% Methanol für 30 Minuten inkubiert und anschließend mit 3 Chargen deionisiertem Wasser gewaschen. Die Tris/Methanol-Inkubation entfärbte die Proteine teilweise und entfernte den Farbstoffüberschuss. Für eine Proteinsequenzierung wurden die Proteine aus der Nitrocellulosemembran ausgeschnitten und einer in situ proteolytischen Spaltung für 3 Stunden bei 37°C in Gegenwart von 10% Acetonitril, 3% Tween-80 in 100 mM Ammoniumbicarbonat, pH 8,3 unterzogen. Die resultierenden Fragmente wurden dann auf einer Micro-Bore Reverse Phase HPLC getrennt. Die ausgewählten Fraktionen wurden automatisch mit Edman-Abbau analysiert. Proteine, die einer Edman-Sequenzierung ohne Entfärbung unterworfen wurden, zeigten eine schwache Signalintensität nach einem Zyklus (initial yield) und nach mehreren Zyklen (repetitive yield). Die teilweise entfärbten Proteine produzierten allerdings Spektren hoher Qualität mit hervorragenden initial yields und repetitive yields.

Beispiel 22. Massenspektrometrie-basierende Matrix-Assisted-Laser-Desorption

[0128] Die zu interessierenden Proteine wurden einer Elektrophorese unterzogen und dann auf eine Polyvinylidendifluoridmembran übertragen, und wie in Beispiel 3 beschrieben, angefärbt. Nachdem die Zielproteine identifiziert worden waren, wurden die Banden mit einer scharfen Rasierklinge ausgeschnitten. Die ausgewählten Banden wurden dann 3 Mal 5 Minuten in 25 mM Ammoniumbicarbonat pH 7,8 und 10% Methanol gewaschen und dann getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Banden in 1–2 mm große Quadrate geschnitten und dann in 20 µg/ml Trypsin-Verdauungspuffer (25 mM Ammoniumbicarbonat, pH 7,8, 1% Octyl-β-Glucosid, 10% Methanol) inkubiert. Es wurde ein ausreichendes Volumen des Trypsin-Verdauungspuffers hinzugegeben, um die Membranstücke zu bedecken. Die Proteine wurden bei Raumtemperatur für 5–6 Stunden verdaut und über Nacht bei 27–28°C inkubiert. Die Peptide wurden mit Ameisensäure/Ethanol (1:1) extrahiert und dann lyophilisiert. Nach der Lyophilisation wurden die Peptide mit Wasser für eine Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) resuspendiert. Gleiche Volumina der verdauten Proteinlösung wurden mit einer α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure-Matrix (10 mg/ml in 70% Acetonitril/H₂O) gemischt. Die Mischung wurde auf die Probeplatten übertragen und für weitere Analysen luftgetrocknet. MALDI-MS-Experimente wurden mit einem Voyager Mass Spectrometer (PerSeptive BioSystems, Framingham, MA, USA) durchgeführt. Das Gerät wurde mit der Substanz-P (1347,7 Da) und Insulin (5731,4 Da) kalibriert. Es wurde, nach den aus dem Trypsin-Verdau erhaltenen Massen in der EMBL-Peptidatenbank mit der PeptideSearch-Engine-, die unter www.mann-embl-heidelberg.de erhältlich ist, gesucht. Die Proteine wurden sofort mit einer guten Übereinstimmung der Proteinsequenz gefunden.

Beispiel 23. Differenzierung lebender und toter Zellen mit Durchflusszytometrie

[0129] Für dieses Experiment wurden Jurkat-Zellen, die von der American Type Culture Collection Co., Manassas, VA bezogen wurden, benutzt. Die Zellen wurden in Suspension in einem RPMI 1640-Serum mit 10% fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin gezüchtet. Die Jurkat-Zellen wurden dann zentrifugiert und als Zell-Pellet gesammelt. Das Pellet wurde dann mit PBS pH 7,2 gewaschen und mit 1000 µL PBS resuspendiert. Ein Aliquot von 250 µL dieser Zellsuspension wurde in ein Eisbad gelegt, während weitere 250 µL dieser Zellsuspension in ein Reagenzglas überführt wurden und dann in einem Wasserbad bei 60°C inkubiert wurden. Nach 10–15 Minuten wurde das Reagenzglas dem Wasserbad entnommen. In ein Mikrozentrifugenröhrchen, das 900 µL PBS enthielt, wurden 5 µL einer 1 mL-Lösung von Verbindung 1 zugefügt. Eine kombinierte Suspension von 50 µL der wärmebehandelten (toten) Zellsuspension und 150 µL der Lebend-Zellsuspension wurden hergestellt. 100 µL der Zellsuspensionsmischung wurden tropfenweise zu der Färbelösung hinzugefügt. In ein anderes Röhrchen, was 900 µL PBS enthielt, wurden 100 µL der vereinten Zellsuspension tropfenweise hinzugefügt. Jede Suspension wurde für drei Minuten auf Eis inkubiert, mit einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und in PBS resuspendiert. Jede Zellgruppe wurde dann in ein separates Cytometrie-Röhrchen überführt. Zu der ungefärbten Probe wurden 5 µM einer Lösung von SYTOX GREEN-Dead-Cell-Stain (Molecular Probes, Inc) bis zu einer Endkonzentration von 0,5 nM hinzugefügt.

[0130] Die Zellsuspensionen wurden mit Durchflusszytometrie analysiert. Die Datenerfassung lieferte ein

Becton-Dickinson FACS Vantage Durchflusszytometer (San Jose, CA). Die 488 nm-Linie eines luftgekühlten Argon-Ionen-Lasers wurde bei 100 mW betrieben. Probenerfassung und Analyse wurden mit einem CellQuest Version 1.2 Software durchgeführt. Die Photomultiplier-Röhrchen (PMT) für die grüne Fluoreszenz-Detektion (SYTOX GREEN Färbung) wurden mit einem 530 +/- 15 nm Emissionsfilter und für die rote Lumineszenz (Verbindung 1) mit einem 630 +/- 11 nm ausgerüstet. Nach der Analyse wurde noch zusätzlicher SYTOX GREEN Farbstoff bis zu einer Endkonzentration von 0,5 nM zur mit Verbindung 1 gefärbten Probe hinzugefügt und die Probe wurde erneut analysiert.

[0131] Die wärmebehandelten (toten) Zellen zeigten mit Verbindung 1 eine ungefähr 10fach hellere Lumineszenz als die lebenden Zellen, was eine leichte Bestimmung der toten Zellen erlaubte. Die Probe, die sowohl mit Verbindung 1 als auch mit SYTOX GREEN, gefärbt wurde, zeigte übereinstimmende grüne und rote Fluoreszenz, womit bewiesen werden konnte, dass eine bevorzugte Anfärbung von toten Zellen auftritt.

[0132] Das Experiment wurde mit Mischungen von mit Wärme behandelten, toten Zellen und lebenden Zellen mit verschiedenen Prozentsätzen wiederholt, so dass der Prozentsatz an toten Zellen in der Mischung 0, 10, 25, 50, 75, 90 und 100% betrug. 100 µL der Mischung wurden dann mit Verbindung 1 angefärbt und mit Zytometrie wie oben analysiert. Die Durchflusszytometrie-Analyse der Mischungen zeigt einen gemessenen Prozentsatz an toten Zellen von 2, 13, 31, 46, 65, 76 und 96% entsprechend.

Patentansprüche

1. Ein Verfahren, das folgendes umfasst:

- a) Kombinieren einer Färbemischung, die einen oder mehrere Metallkomplexe enthält und einer Probemischung, die eine Polyaminosäure enthält, um eine kombinierte Mischung zu bilden; wobei jeder der Metallkomplexe, die gleich oder voneinander verschieden sein können einen oder mehrere Übergangsmetallionen der Gruppen 7, 8, 9 oder 10 umfasst, wobei das erwähnte Metallion eine Atomzahl größer als 42 und eine Vielzahl von Stickstoffdonoren hat, die vollständig an das Metallion koordiniert sind, wobei jeder Stickstoffdonorligand, die gleich oder voneinander verschieden sein können, ein Pyridin, Bipyridin, Bispyridin, Terpyridin, Phenanthrolin, Bathophenanthrolin, Imidazol, Pyrrol, Pyrazol, Indazol, Triazol, Pyrazin, Pyrimidin, Pyridazin, Purin, Porphyrin oder Phthalocyanin ist, wobei der stickstoffhaltige Ring optional mit einem aromatischen Ring anneliert ist und wenigstens einer der erwähnten Stickstoff-Donorliganden mit wenigstens einer Sulfatgruppe substituiert ist, die aus der Säure $-SO_3H$, einem Sulfonation oder einem Sulfonatsalz ausgewählt werden kann, hat; und weiterhin vorausgesetzt dass der erwähnte Metallkomplex neutral oder anionisch in seiner Gesamtladung ist;
- b) Inkubieren der kombinierten Mischung für eine Zeitspanne, die ausreicht, um den erwähnten Metallkomplex mit der Polyaminosäure zu assoziieren, um einen gefärbten Poly(aminosäuren)-Komplex zu bilden, der eine detektierbare optische Antwort unter Beleuchtung gibt;
- c) Beleuchten des Farbstoff-Poly(aminosäure)-Komplexes; und
- d) Beobachten der erwähnten optischen Antwort.

2. Ein Verfahren nach Anspruch 1, wobei in der Färbemischung wenigstens ein Metallion ein Ruthenium, ein Osmium, ein Rhenium oder ein Platin ist.

3. Ein Verfahren nach einem beliebigen der vorherigen Ansprüche, wobei das Metallion in der Färbemischung ein Monokation oder ein Dikation ist.

4. Ein Verfahren nach Anspruch 1, wobei das in der Färbemischung vorkommende Metallion ein Ruthenium(II)- oder Rhenium(I)-Ion ist.

5. Ein Verfahren nach einem beliebigen der vorherigen Ansprüche, wobei die erwähnten heteroaromatischen Ringe, die ein Stickstoffatom enthalten auch ein oder mehrere zusätzliche Heteroatome einschließen, die gleich sind oder sich voneinander unterscheiden und N, O oder S sind; und die erwähnten heteroaromatischen Ringe optional mit Halogenatomen, CN, Alkyl, Perfluoralkyl oder Alkoxy, wobei jeder Rest 1–6 Kohlenstoffatome hat, Carboxy, Carboxyalkyl, Carboxyalkoxy, Carboxyalkylamino Carboxyalkylthio, wobei jeder Rest 2–7 Kohlenstoffatome hat, Amino, Aminosalze, Alkylamino oder Dialkylamino, wobei jede Gruppe 1–6 Kohlenstoffatom hat, Aryl, Heteroaryl oder einem oder mehr zusätzlichen geschlossenen aromatischen Ringen substituiert sein können.

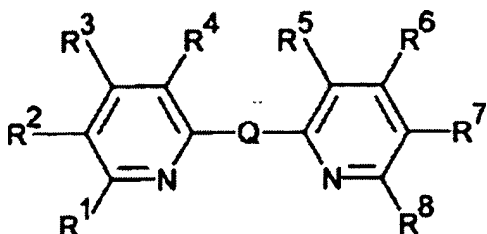
6. Ein Verfahren nach einem beliebigen der vorherigen Ansprüche, wobei die in der Färbemischung erwähnten Stickstoff-Donor-Liganden, welche gleich sind oder sich voneinander unterscheiden, substituierte Bi-

pyridyle, Bis-Bipyridyle, Phenanthroline, Bathophenanthroline oder Terpyridyle sind.

7. Ein Verfahren nach Anspruch 6, wobei die erwähnten Stickstoff-Donor-Liganden Phenanthroline oder Bathophenanthroline sind.

8. Ein Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, wobei die Phenanthroline oder Bathophenanthroline keine zusätzlichen Ringe enthalten.

9. Ein Verfahren nach einem der beliebigen Ansprüche 1 bis 4, wobei die Färbemischung mindestens einen Stickstoff-Donor-Liganden enthält, der die Formel



hat,

wobei die Substituenten R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 und R^8 unabhängig aus Wasserstoff, Halogen, einem anionischen Rest, CN, Alkyl, Perfluoralkyl, oder Alkoxy, wobei jeder Rest 1–6 Kohlenstoffatome hat, Carboxy, Carboxyalkyl, Carboxyalkoxy, Carboxyalkylamino oder Carboxyalkylthio, wobei jeder Rest 2–7 Kohlenstoffatome hat, Amino, Aminosalz, Alkylamino oder Dialkylamino, wobei jede Alkylgruppe 1–6 Kohlenstoffatome hat, Aryl Heteroaryl oder aus zwei benachbarten Substituenten aus R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 und R^8 , die miteinander zu einem geschlossenen aromatischen Ring kombiniert werden können, der optional mit einem Halogen, einem anionischen Rest, Cyano, Alkyl, Perfluoralkyl oder Alkoxy, wobei jeder Rest 1–6 Kohlenstoffatome hat, Amino, Alkylamino, wobei jeder Rest 1–6 Kohlenstoffatome hat, Dialkylamino, wobei jeder Rest bis 12 Kohlenstoffatome hat, Carboxy, oder Carboxyalkyl, Carboxyalkoxy, Carboxyalkylamino oder Carboxyalkylthio, wobei jeder Rest 2–7 Kohlenstoffatome hat, substituiert ist, ausgewählt werden können;

wobei jeder Aryl- oder Heteroarylrest optional und unabhängig mit Wasserstoff, Halogen, CN, Perfluoralkyl oder Alkoxy, wobei jeder Rest 1–6 Kohlenstoffatome hat, Carboxy, Carboxyalkyl, Carboxyalkoxy, Carboxyalkylamino oder Carboxyalkylthio, wobei jeder Rest 2–7 Kohlenstoffatome hat, Amino, Aminosalz, Alkylamino oder Dialkylamino, wobei jede Alkylgruppe 1–6 Kohlenstoffatome hat oder ein anionischer Rest ist, substituiert ist; Q eine kovalente Einfachbindung ist, oder Q eine formale Einfachbindung ist und R^4 und R^5 in Kombination $-\text{CR}^9=\text{CR}^{10}-$ sind oder $Q-(\text{CR}^{11})_a-\text{X}_b-(\text{CR}^{12})_c-$ ist, wobei jedes aus a, b und c 0 oder 1 ist und Q ein 2,6-disubstituierter Pyridylrest ist;

wobei R^9 und R^{10} unabhängig aus Wasserstoff, Halogen, CN, Perfluoralkyl oder Alkoxy wobei jeder Rest 1–6 Kohlenstoffatome hat, Carboxy, Carboxyalkyl, Carboxyalkoxy, Carboxyalkylamino oder Carboxyalkylthio, wobei jeder Rest 2–7 Kohlenstoffatome hat, Amino, Aminosalz, Alkylamino oder Dialkylamino, wobei jede Alkylgruppe 1–6 Kohlenstoffatome hat oder aus einem anionischen Rest ausgewählt werden können;

R^{11} und R^{12} sind unabhängig ausgewählt aus H oder Alkyl, das 1–6 Kohlenstoffatome hat;

X ist optional O, S, NR^{13} oder $-\text{CR}^{14}\text{R}^{15}$;

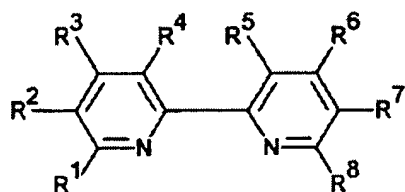
wobei R^{13} H, C_1 - C_6 -Alkyl oder Phenyl, das optional weiterhin einfach oder mehrfach substituiert in beliebiger Kombination mit Alkyl, Perfluoralkyl oder Alkoxy, wobei jeder Rest 1–6 Kohlenstoffatome hat, einem anionischen Rest, Amino, Alkylamino oder Dialkylamino, wobei jede Alkylgruppe 1–6 Kohlenstoffatome hat, Carboxy, Carboxyalkyl, Carboxyalkoxy, Carboxyalkylamino oder Carboxyalkylthio, wobei jeder Rest 2–7 Kohlenstoffatome hat, Halogen oder CN substituiert ist; und

R^{14} und R^{15} unabhängig aus H oder Alkyl, das 1–6 Kohlenstoffatome hat, oder aus einem anionischen Rest ausgewählt werden können;

erwähnter 2,6-disubstituierter Pyridyl-Rest optional weiterhin mit Perfluoralkyl oder Alkoxy wobei jeder Rest 1–6 Kohlenstoffatome hat, Sulfonsäure, Sulfonsäuresalz, Amino, Alkylamino oder Dialkylamino, wobei jede Alkylgruppe 1–6 Kohlenstoffatome hat, Carboxy, oder Carboxyalkyl, Carboxyalkoxy, Carboxyalkylamino oder Carboxyalkylthio, wobei jeder Rest 2–7 Kohlenstoffatome hat oder mit Halogen substituiert ist;

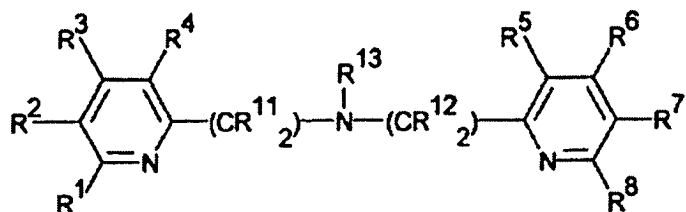
vorausgesetzt, dass der erwähnte Stickstoff-Donor-Ligand direkt oder indirekt mit wenigstens einem anionischen Rest, welches ein Sulfonat (entweder als Säure $-\text{SO}_3\text{H}$, Sulfonat oder Sulfonsäuresalz) sein kann.

10. Ein Verfahren nach Anspruch 9, wobei der erwähnte Stickstoff-Donor-Ligand die Formel



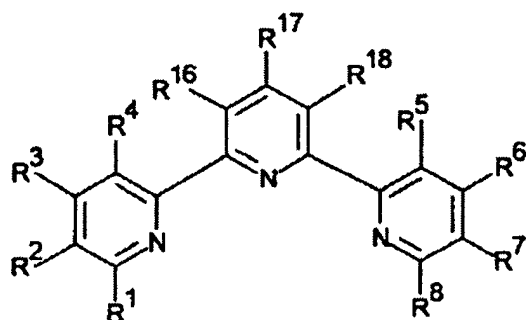
hat, wobei R¹–R⁶ wie vorher definiert sind und jeder anionische Rest ein Sulfonat (ob als Säure -SO₃H, Sulfonat oder Sulfonsäuresalz) ist.

11. Ein Verfahren nach Anspruch 9, wobei der erwähnte Stickstoff-Donor-Ligand die Formel



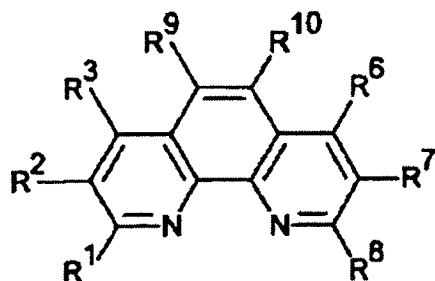
hat, wobei R¹–R⁸, R¹¹, R¹² und R¹³ wie zuvor definiert sind und jeder anionische Rest als Sulfonat (ob als Säure -SO₃H, Sulfonat oder Sulfonsäuresalz) vorliegt.

12. Ein Verfahren nach Anspruch 9, wobei der erwähnte Stickstoff-Donor-Ligand die Formel



hat, wobei R¹–R⁴ und R⁵–R⁸ wie vorher definiert sind;
wobei R¹⁶, R¹⁷ und R¹⁸ unabhängig H, Alkyl, Perfluoralkyl oder Alkoxy wobei jeder Rest 1–6 Kohlenstoffatome hat, einem anionischen Rest, Amino, Alkylamino oder Dialkylamino, wobei jede Alkylgruppe 1–6 Kohlenstoffatome hat, Carboxy, oder Carboxyalkyl, Carboxyalkoxy, Carboxyalkylamino oder Carboxyalkylthio, wobei jeder Rest 2–7 Kohlenstoffatome hat, Halogen oder CN sind; und
jeder anionische Rest als Sulfonat (ob als Säure -SO₃H, Sulfonat oder Sulfonsäuresalz) vorliegt.

13. Ein Verfahren nach Anspruch 9, wobei der erwähnte Stickstoff-Donor-Ligand die Formel



hat, wobei R¹–R³, R⁶–R⁸, R⁹ und R¹⁰ wie vorher definiert sind; und und jeder anionische Rest als Sulfonat (ob als Säure -SO₃H, Sulfonat oder Sulfonsäuresalz) vorliegt.

14. Ein Verfahren nach Anspruch 13, wobei R³ und R⁶ Phenylreste sind, die optional und unabhängig mit mindestens einer Sulfonsäure oder Sulfonsäuresalz substituiert sind.

15. Ein Verfahren nach einem beliebigen der vorherigen Ansprüche, wobei die detektierbare optische Antwort eine Lumineszenz-Antwort ist.

16. Ein Verfahren nach einem beliebigen der vorherigen Ansprüche, weiterhin umfassend, eine Übertragung der Probemischung auf eine feste oder halb feste Matrix bevor oder nach der Kombination mit der Färbemischung.

17. Ein Verfahren nach Anspruch 16, wobei die feste, halb feste Matrix Glassfolie, Multi-Well-Plates, Plastikpins, Polymermembranen, polymere Beads, Halbleitermaterial, Filtermembranen oder Elektrophoresemedien umfasst.

18. Ein Verfahren nach einem beliebigen der vorherigen Ansprüche, weiterhin umfassend,
a) elektrophoretisches Trennen der Probemischung bevor oder während diese mit der Färbemischung kombiniert wird; und/oder
b) Analysieren der Poly(aminosäuren) mit Massenspektroskopie; und/oder
c) Analysieren der Poly(aminosäuren) mit Edman-Abbau; und/oder
d) Quantifizieren der erwähnten Poly(aminosäuren) durch Messen der erwähnten optischen Antwort und Vergleichen des erwähnten Messwertes mit einem Standardwert; und/oder
e) Hinzufügen eines zusätzlichen Reagenzes zur Probemischung, der Färbemischung oder der kombinierten Mischung.

19. Ein Verfahren nach Anspruch 18, wobei die elektrophoretische Trennung, der Beleuchtungsschritt oder der Beobachtungsschritt mit automatisierenden Methoden durchgeführt wird.

20. Ein Verfahren nach einem beliebigen der vorherigen Ansprüche, der ferner die Trennung der Probemischung-Komponenten bevor, während oder nach Kombination mit der Färbemischung umfasst, wobei dieser Schritt mit Verfahren der Durchflusszytometrie, elektrophoretischen Verfahren oder mikrofluiden Verfahren bewerkstelligt wird.

21. Eine Methode nach Anspruch 20, wobei die erwähnte Probemischung Zellen umfasst und der erwähnte Trennungsschritt mit Durchflusszytometrie durchgeführt wird und die detektierbare optische Antwort mit der Zellviabilität korreliert ist.

22. Eine Lösung, die folgendes umfasst:
einen Metallkomplex, wie in Anspruch 1 definiert; vorausgesetzt, dass der erwähnte Metallkomplex eine neutrale oder negative Gesamtladung besitzt;
wobei der erwähnte Metallkomplex in einer Konzentration von 0.1 μM bis 10 μM vorliegt;
ein polares organisches Lösungsmittel in einer Konzentration von 5–50%; und
entweder eine saure Komponente in einer Konzentration von 1%–20% oder ein anorganisches Salz in einer Konzentration von 1–50% oder beides vorliegt.

23. Eine Lösung nach Anspruch 22, wobei wenigstens ein Stickstoff-Donor-Ligand wie in Ansprüchen 9 bis 14 definiert ist.

24. Eine Lösung nach Anspruch 22 oder 23, wobei wenigstens ein Metallion ein Ruthenium, ein Osmium, ein Rhenium oder ein Platin ist.

25. Eine Lösung nach einem beliebigen der Ansprüche 22 bis 24, wobei das Metallion monokationisch oder dikationisch ist.

26. Eine Lösung nach einem beliebigen der Ansprüche 22 bis 25, wobei wenigstens ein Metallion ein Ruthenium(II) oder ein Rhenium(I) ist.

27. Eine Lösung nach einem beliebigen der Ansprüche 22 bis 26, wobei das erwähnte Lösungsmittel ein Alkohol, der 1–6 Kohlenstoffatome hat oder ein Diol oder Triol der 2–6 Kohlenstoffatome hat, ist.

28. Eine Lösung nach Anspruch 27, wobei der erwähnte Alkohol Methanol, Ethanol, 1,2-Ethandiol oder 1,2-Propandiol in einer Konzentration von 30%–40% ist.

29. Eine Lösung nach einem beliebigen der Ansprüche 22 bis 28, wobei die erwähnte saure Komponente Essigsäure, Trichloressigsäure, Perchloressigsäure oder Phosphorsäure in einer Konzentration von 1–20% ist.

30. Eine Lösung nach Anspruch 29, wobei die erwähnte saure Komponente Trichloressigsäure ist und in

einer Konzentration von 12,5% vorliegt und das erwähnte organische Lösungsmittel 1,2-Propandiol ist und in einer Konzentration von 25% vorliegt.

31. Eine Lösung nach einem beliebigen der Ansprüche 22 bis 30, wobei die erwähnten anorganischen Salze Ammoniumsulfat oder Magnesiumchlorid sind und in einer Konzentration von 5–20% vorliegen.

32. Eine Lösung nach einem beliebigen der Ansprüche 22 bis 31, wobei die erwähnte Lösung eine wässrige Lösung ist.

33. Ein Kit, des eine wässrige Lösung eines Metallkomplexes, wie nach einem beliebigen der Ansprüche 22 bis 32 definiert, umfasst, wobei der erwähnte Metallkomplex in einer Konzentration von 0.1 μM bis 10 μM vorliegt und weiterhin optional Pufferagenzien, Antioxidantien, Metallchelatoren oder zusätzliche Detektionsreagenzien in der gleichen oder in einer anderen wässrigen Lösung umfasst.

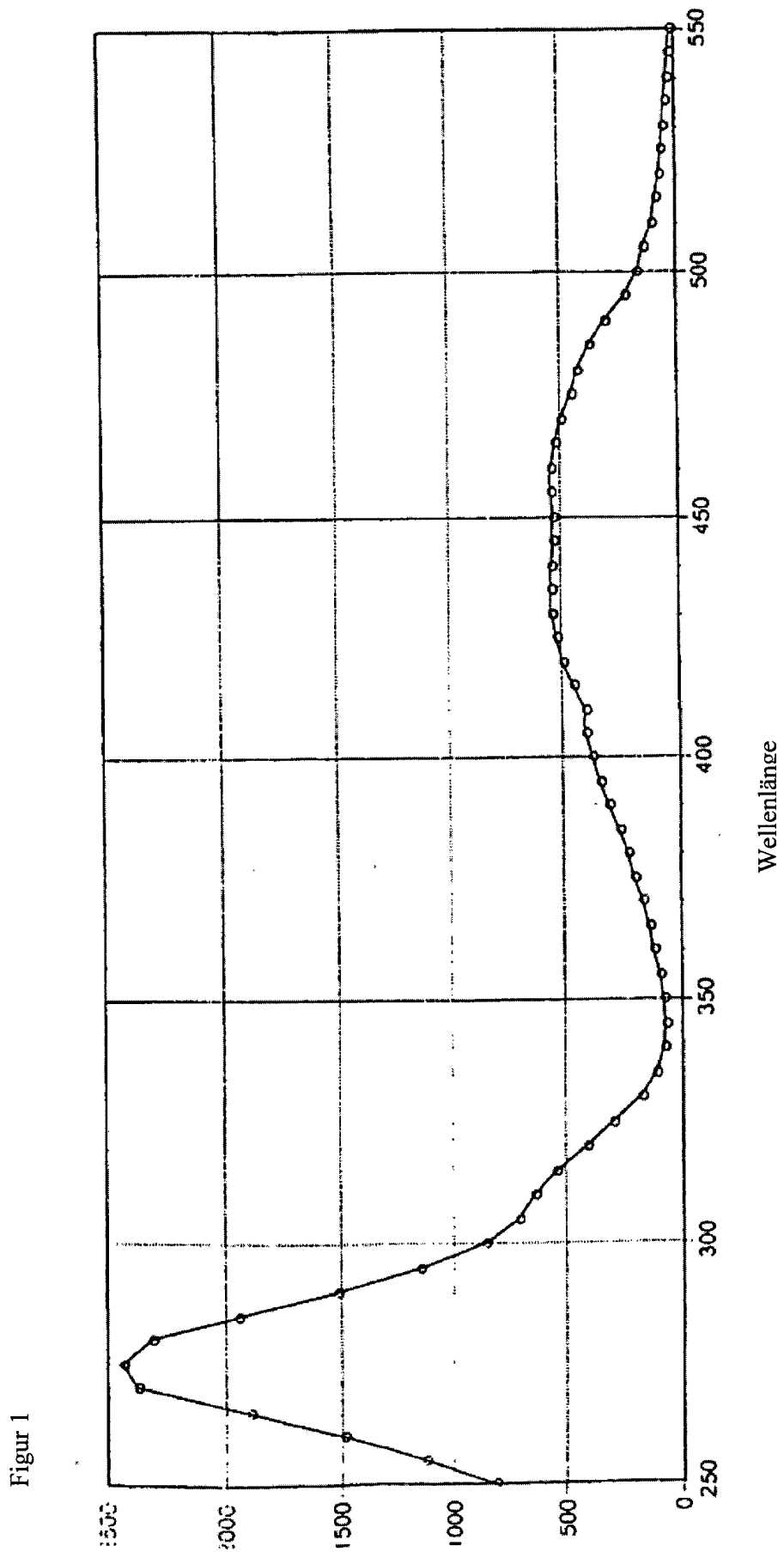
34. Die Verwendung eines Metallkomplexes nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 14 um Poly(amino-säuren) zu detektieren.

35. Die Verwendung eines Metallkomplexes nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 14 als ein Univer-salfärbemittel für Proteine.

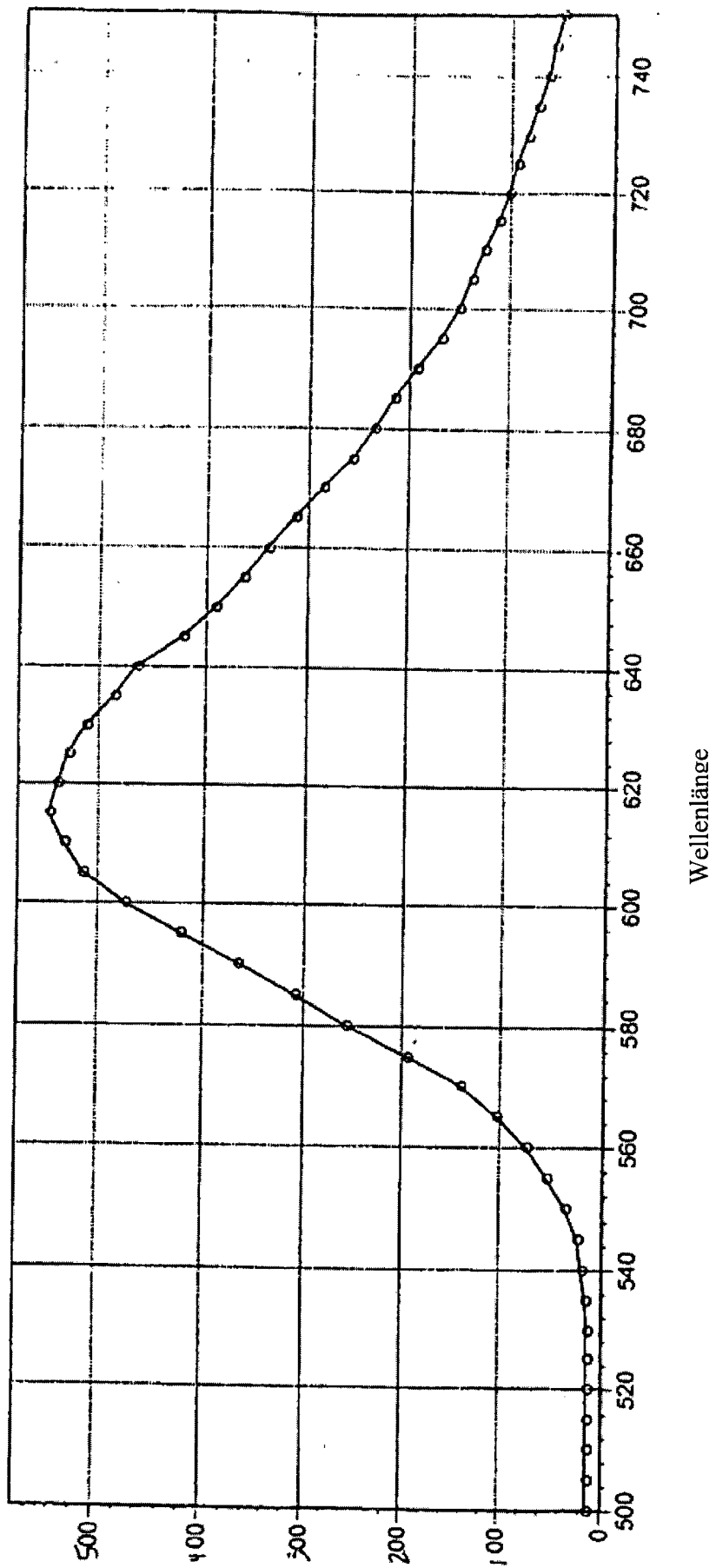
36. Die Verwendung eines Metallkomplexes nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 14, um das Ge-samtproteinprofil einer 2D-Gelelektrophorese zu bestimmen.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

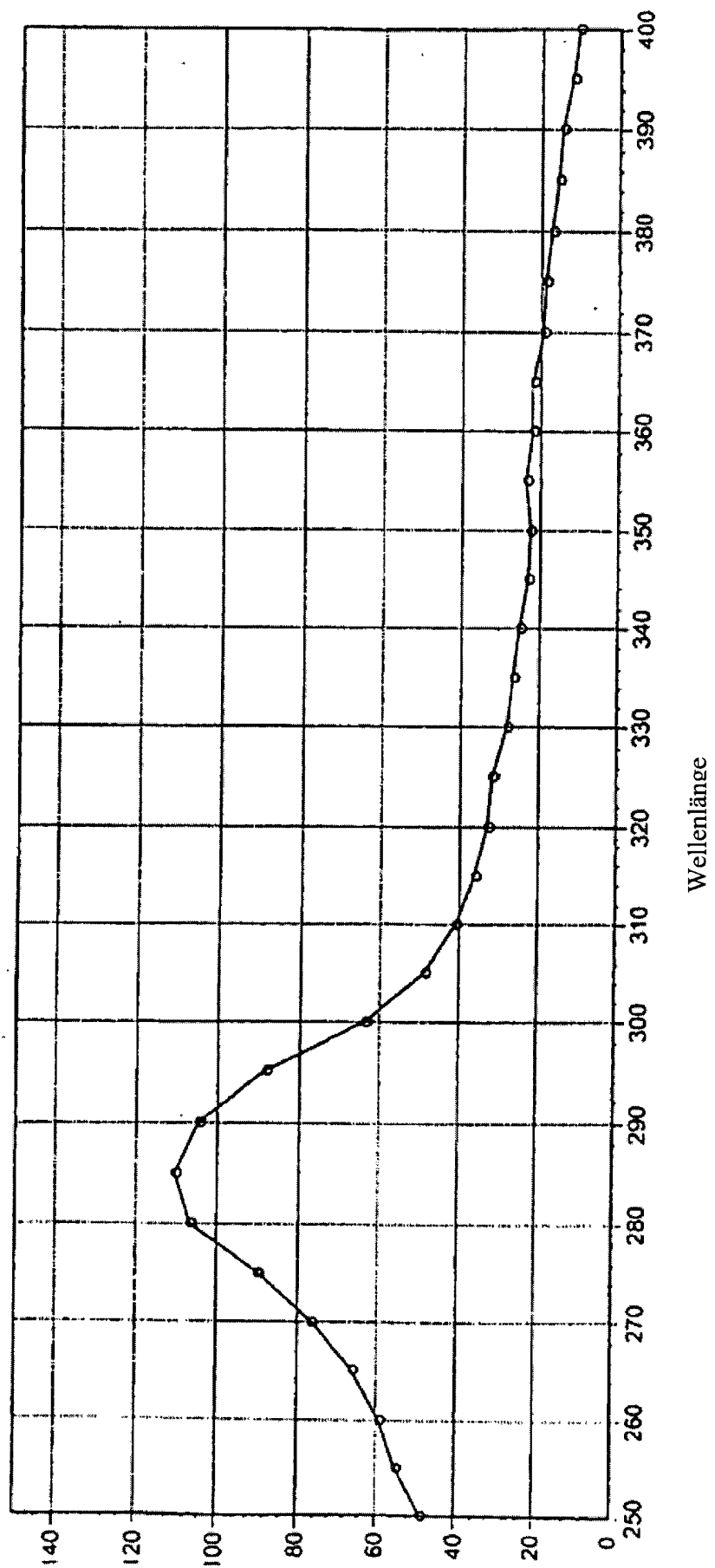
Anhängende Zeichnungen



Figur 2



Figur 3



Figur 4

