

Mark Helm und Stefan Wölfl

Instrumentelle Bioanalytik

Einführung für Biologen, Biochemiker, Biotechnologen
und Pharmazeuten



WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|----------|
| 1 | Philosophie statt Vorwort | 1 |
| 1.1 | Das Kürzel Ph.D. | 1 |
| 1.2 | Modell, Hypothese, Theorie – Die Abbildung der Wahrheit | 3 |
| 1.3 | Kann das wahr sein? | 5 |
| | | |
| 2 | Strahlung | 9 |
| 2.1 | Radioaktivität | 9 |
| 2.1.1 | Allgemeines zur Radioaktivität | 9 |
| 2.1.2 | Detektion von Radioaktivität | 13 |
| 2.1.3 | Anwendungsbeispiel von Radioaktivität | 14 |
| 2.2 | Eigenschaften von elektromagnetischer Strahlung | 15 |
| 2.2.1 | Allgemeines | 15 |
| 2.2.2 | Felder und Energieinhalt einer elektromagnetischen Welle | 16 |
| 2.2.3 | Wechselwirkung mit Materie: Dipolmomente und Interferenz oszillierender Felder | 18 |
| 2.2.4 | Brechung elektromagnetischer Wellen und Refraktometrie | 21 |
| 2.2.5 | Polarimetrie | 24 |
| 2.2.6 | Weitere analytische Anwendungen von polarisiertem Licht: Optische Rotationsdispersion und Zirkularer Dichroismus | 31 |
| 2.2.7 | Beugung elektromagnetischer Wellen, Welle-Teilchen-Dualismus und Quantenchemie | 33 |
| 2.2.8 | Spektroskopie: Emission, Absorption und Streuung von elektromagnetischer Strahlung | 35 |
| 2.2.9 | Das Lambert-Beersche Gesetz | 38 |
| 2.3 | UV-VIS-Absorptionsspektroskopie elektronischer Übergänge | 41 |
| 2.3.1 | Allgemeines zur UV-VIS-Absorptionsspektroskopie | 41 |
| 2.3.2 | Theorien der chemischen Bindung | 43 |
| 2.3.3 | Chromophore in der molekularen UV-VIS-Spektroskopie | 47 |
| 2.3.4 | Konzentrationsbestimmung durch UV-VIS-Spektroskopie | 54 |
| 2.3.5 | Anwendungsbeispiele der UV-VIS-Spektroskopie in den Biowissenschaften | 57 |
| 2.4 | UV-VIS-Emissionsspektroskopie von molekularen Analyten | 59 |
| 2.4.1 | Allgemeines zur UV-VIS-Emissionsspektroskopie | 59 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 2.4.2 | Multiplizitäten von Elektronenzuständen | 60 |
| 2.4.3 | Chemolumineszenz, Fluoreszenz und Phosphoreszenz | 62 |
| 2.4.4 | Absorptionsspektrum, Anregungsspektrum | 63 |
| 2.4.5 | Lebensdauer, Fluoreszenzanisotropie und Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer | 68 |
| 2.4.6 | Anwendungsbeispiel der Emissionsspektroskopie | 69 |
| 2.5 | Schwingungsspektroskopie | 70 |
| 2.5.1 | Allgemeines zur Schwingungsspektroskopie | 71 |
| 2.5.2 | Freiheitsgrade | 72 |
| 2.5.3 | Geometrie der Schwingungen und symmetriebedingte Auswahlregeln | 75 |
| 2.5.4 | Harmonischer und anharmonischer Oszillator | 77 |
| 2.5.5 | Geräteaufbau und Absorptionsspektren im IR-Bereich | 82 |
| 2.5.6 | Teilbereich des IR-Spektrums, Konzept der lokalisierten Schwingung und Einfluss der Masse | 83 |
| 2.5.7 | Anwendungsbeispiel | 84 |
| 2.5.8 | Die Boltzmann-Verteilung | 86 |
| 2.5.9 | Raman-Spektroskopie | 87 |
| 2.6 | Kernresonanzspektroskopie – NMR | 89 |
| 2.6.1 | Allgemeines und Anwendungsgebiete | 89 |
| 2.6.2 | Physikalische Grundlagen | 90 |
| 2.6.3 | Bedeutung von Absorption und induzierter Emission für die Empfindlichkeit | 95 |
| 2.6.4 | Aufnahmetechniken von NMR-Spektren | 96 |
| 2.6.5 | Makroskopische Magnetisierung, Quermagnetisierung und die Relaxationszeiten | 98 |
| 2.6.6 | Die chemische Verschiebung | 100 |
| 2.6.7 | Kopplungen | 103 |
| 2.6.8 | Anwendungsbeispiel: Strukturaufklärung einer unbekanntten Verbindung | 108 |
| 2.6.9 | Weiterführende Techniken: Entkopplung, NOE und zweidimensionales NMR | 113 |

3 Trennung 117

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.1 | Grundlagen der Chromatographie | 117 |
| 3.1.1 | Allgemeines zur Chromatographie | 117 |
| 3.1.2 | Verteilungs- und Adsorptionschromatographie | 118 |
| 3.1.3 | Wichtige Größen: Retentionszeit, Kapazitätsfaktor, Selektivität | 120 |
| 3.1.4 | Peakform | 124 |
| 3.1.5 | Trennstufenhöhe und Van-Deemter-Gleichung | 126 |
| 3.1.6 | Auflösung und Optimierung | 129 |
| 3.2 | Gaschromatographie | 131 |
| 3.2.1 | Allgemeines zur GC | 131 |
| 3.2.2 | Geräteaufbau: Gasversorgung, Injektor, Ofen und Säulen | 133 |
| 3.2.3 | Detektoren in der GC | 134 |

- 3.2.4 Messgrößen in der GC 136
- 3.2.5 Anwendungsbeispiel 138
- 3.3 Flüssigchromatographie 139
 - 3.3.1 Allgemeines zur Flüssigchromatographie 140
 - 3.3.2 Geräteaufbau: Fließmittelbewegung, Probenaufgabe, Säulen 140
 - 3.3.3 Detektoren in der Flüssigchromatographie 143
 - 3.3.4 Normal- und Umkehrphase 144
 - 3.3.5 Ionenaustauschchromatographie 147
 - 3.3.6 Größenausschlusschromatographie 149
 - 3.3.7 Anwendungsbeispiel: Aufreinigung eines Proteins durch Affinitätschromatographie 151
- 3.4 Dünnschichtchromatographie 153
 - 3.4.1 Allgemeines 153
 - 3.4.2 Messgrößen in der Dünnschichtchromatographie 155
 - 3.4.3 Anwendungsbeispiel: Trennung von Nukleotiden durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie 156
- 3.5 Elektrophorese 157
 - 3.5.1 Physikalische Grundlagen der Elektrophorese 158
 - 3.5.2 Zonenelektrophorese 159
 - 3.5.3 Isotachophorese 162
 - 3.5.4 Isoelektrische Fokussierung 163
 - 3.5.5 Trennung und Detektion von Analyten in der Praxis 165
 - 3.5.6 Anwendungsbeispiel 166
- 4 Massenspektrometrie 169**
 - 4.1 Allgemeines 169
 - 4.2 Ionisationsmethoden 171
 - 4.3 Massenanalytoren und Detektoren 173
 - 4.4 Interpretation von Massenspektren: Molekülion, Isotopenmuster und Fragmentierungsmuster 176
 - 4.5 Anwendungsbeispiel 181
- 5 Biosensoren, Biochips und biologische Systeme 185**
 - 5.1 Einführung 185
 - 5.2 Biosensoren 187
 - 5.2.1 Messungen molekularer Wechselwirkungen 188
 - 5.2.2 Biosensoren für die Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen 192
 - 5.2.3 Oberflächen-Plasmon-Resonanz 192
 - 5.2.4 Biosensoren zum Nachweis von markierten Proben 197
 - 5.2.5 Weitere Methoden für die Messung biomolekularer Interaktionen: Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer 199

- 5.3 Biochips und Mikroarrays: Viele Parameter gleichzeitig bestimmen 201
 - 5.3.1 DNA-Mikroarrays 202
 - 5.3.2 Herstellung von DNA-Chips 204
 - 5.3.3 Immobilisierung von Sonden im Arrayformat: Spotten 205
 - 5.3.4 In-situ-Synthese von DNA-Mikroarrays 206
 - 5.3.5 Vergleich der Herstellungsverfahren Spotten und in-situ-Synthese 207
 - 5.3.6 Nachweis komplementärer Nukleinsäuremoleküle durch Hybridisierung 208
 - 5.3.7 Anwendungen von Biochips und Mikroarrays 210
- 5.4 Protein- und Peptid-Mikroarrays 213
 - 5.4.1 Vom Protein zur Antikörpersonde 214
 - 5.4.2 Anwendungen von Protein- und Peptidarrays 215
- 5.5 Nachweis von Veränderungen in Zellen 216
 - 5.5.1 Fluoreszenzaktivierte Cytometrie 216
 - 5.5.2 Bedeutung der fluoreszenzaktivierten Cytometrie 220
 - 5.5.3 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung 221

Literatur 223

Index 225