

Manfred H. Gey

Instrumentelle Bioanalytik

**Biosubstanzen, Trennmethode,
Strukturanalytik, Applikationen**

Mit 312 Abbildungen und 17 Tabellen

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	V
Inhaltsverzeichnis	VII
Abkürzungen	XIII
Symbole	XVIII
1 Einleitung	1
2 Biomoleküle	9
2.1 Proteine.....	9
2.1.1 Aminosäurestrukturen.....	10
2.1.1.1 Zwitterionenform und pH-Abhängigkeit.....	12
2.1.1.2 pK-Werte und isoelektrischer Punkt.....	13
2.1.1.3 D- und L-Konfiguration.....	14
2.1.2 Proteinstrukturen.....	14
2.1.2.1 Peptidbindung.....	14
2.1.2.2 Sulfidbindung.....	15
2.1.2.3 Aminosäuresequenz.....	15
2.1.2.4 Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quarternärstruktur.....	18
2.1.2.5 α -Helix und β -Faltblatt.....	18
2.1.3 Denaturierung und Redenaturierung.....	20
2.1.4 Glutathion- und Metallothioneinstrukturen.....	21
2.2 Nucleinsäuren.....	24
2.2.1 Strukturen.....	24
2.2.2 Doppelhelix, Basenpaarung und Replikation.....	27
2.2.3 Translation und Transkription.....	30
2.2.4 Die Polymerasekettenreaktion.....	30
2.3 Glycoproteine.....	33
2.3.1 Strukturen.....	33
2.3.1.1 N-glycosidische Bindung.....	35
2.3.1.2 O-glycosidische Bindung.....	37

2.3.2 Isolierung von Glycoproteinen aus Membranen.....	37
2.3.3 Enzymatische Sequenzierung der Glycane.....	42
2.3.4 Freisetzung der Glycane aus Proteinen.....	45
2.3.4.1 Enzymatische Isolierung.....	45
2.3.4.2 Hydrazinolyse.....	46
2.3.5 Markieren der Glycane.....	46
2.3.5.1 Fluoreszenzmarkierung mit 2-AB und BAP.....	47
2.3.5.2 Radioaktive Markierung.....	48
2.4 Lipide.....	49
2.4.1 Strukturen.....	49
2.4.2 Biosyntheseprozesse.....	53
2.4.2.1 Cholesterin und Squalen.....	53
2.4.2.2 Ceramid und Cerebrosid.....	54
3 Prechromatographische Methoden.....	57
3.1 Lysozymbehandlung.....	57
3.2 Aussalzen.....	58
3.3 Lyophilisation.....	60
3.4 Dialyse.....	61
3.5 Ultrazentrifugation.....	61
3.6 Batch-Adsorption.....	63
3.7 Flüssig-flüssig-Extraktion.....	64
3.8 Filtration.....	65
3.8.1 Mikrofiltration.....	66
3.8.2 Ultrafiltration.....	67
4 Flüssigchromatographie.....	71
4.1 Hochleistungsflüssigchromatographie.....	71
4.1.1 Grundlagen des Trennprozesses.....	72
4.1.2 Apparative Grundlagen.....	80
4.1.3 Trennsysteme.....	90
4.1.3.1 Normalphasenchromatographie.....	90
4.1.3.2 Chemisch modifizierte Phasen und Reversed-Phase-Chromatographie.....	90
4.1.3.3 Chirale Trennsysteme.....	92

4.2 Spezielle Trennmethoden und-Systeme.....	95
4.2.1 Ionenpaarchromatographie.....	95
4.2.2 Ionenausschlußchromatographie.....	96
4.2.3 Anionenaustauschchromatographie mit gepulst-amprometrischer Detektion....	98
4.2.4 Ionenchromatographie.....	99
4.3 Biochromatographie.....	101
4.3.1 Chromatographie an Hydroxylapatit.....	103
4.3.2 Größenausschlußchromatographie.....	104
4.3.3 Ionenaustauschchromatographie.....	106
4.3.4 Hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie.....	110
4.3.5 Affinitätschromatographie.....	112
4.3.6 Kovalente Chromatographie.....	115
4.3.7 Chromatographie an porösen Glaskugeln.....	118
4.3.8 Perfusionschromatographie.....	119
5 Elektrophorese-Techniken.....	123
5.1 Klassische Elektrophorese.....	123
5.1.1 Trägerfreie und trägergestützte Elektrophorese.....	123
5.1.2 Zonenelektrophorese.....	125
5.1.3 Disk-Elektrophorese.....	126
5.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	127
5.1.5 Isotachophorese.....	129
5.1.6 Isoelektrische Fokussierung.....	130
5.2 Kapillarelektrophorese.....	132
5.2.1 Apparative Grundlagen.....	132
5.2.1.1 Aufbau einer Kapillarelektrophorese-Apparatur.....	132
5.2.1.2 Injektionstechniken.....	133
5.2.1.3 Trennkapillaren.....	133
5.2.1.4 Detektion.....	134
5.2.2 Trennphänomene.....	135
5.2.2.1 Elektrophoreseprinzip.....	135
5.2.2.2 Elektroosmotischer Fluß.....	136
5.2.3 Trennmechanismen.....	138
5.2.3.1 Kapillarzonenelektrophorese.....	138
5.2.3.2 Kapillargelelektrophorese.....	138
5.2.3.3 Isoelektrische Fokussierung.....	139
5.2.3.4 Isotachophorese.....	139
5.2.3.5 Micellare Elektrokinetische Chromatographie.....	139
5.2.3.6 Kapillar-Elektrochromatographie.....	141

6 Strukturanalytische Methoden	145
6.1 UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie.....	145
6.1.1 Spektralbereiche.....	147
6.1.2 Wechselwirkungen zwischen Strahlung und Substanz.....	149
6.1.3 Lambert-Beer'sches Gesetz.....	150
6.1.4 Aufbau eines Spektralphotometers.....	151
6.1.5 Fluoreszenzspektroskopie.....	152
6.2 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie.....	153
6.2.1 Magnetfeld, Kernanregung und Kernspin.....	154
6.2.2 Resonanzbedingung.....	157
6.2.3 Relaxation.....	158
6.2.4 Impulsverfahren.....	159
6.2.5 Chemische Verschiebung.....	159
6.2.6 Spin-Spin-Kopplung.....	161
6.2.7 Aufbau eines NMR-Spektrometers.....	162
6.2.8 Strukturaufklärung.....	163
6.3 Massenspektrometrie.....	166
6.3.1 Aufbau eines Massenspektrometers.....	166
6.3.2 Harte Ionisationsarten.....	168
6.3.2.1 Elektronenstoßionisation.....	168
6.3.3 Weiche Ionisationsarten.....	169
6.3.3.1 Thermospray.....	170
6.3.3.2 Chemische Ionisation.....	170
6.3.3.3 Fast Atom Bombardement.....	170
6.3.3.4 Electrospray.....	171
6.3.3.5 Feldionisation.....	171
6.3.3.6 Feiddesorption.....	172
6.3.4 Spektrometertypen.....	172
6.3.4.1 Magnetfeld-Sektorfeld-Massenspektrometer.....	172
6.3.4.2 Flugzeitmassenspektrometer.....	174
6.3.4.3 Quadrupolmassenspektrometer.....	175
6.3.4.4 Tandemmassenspektrometer.....	175
6.3.6 Spektrenvergleich zwischen harter und weicher Ionisation.....	176
6.4 Laser Desorptions/Ionisations - Massenspektrometrie.....	177
6.4.1 Aufbau von MALDI-TOF-MS-Geräten.....	178
6.4.2 Probepräparation.....	180
6.4.3 Molekulargewichtsbestimmung mittels MALDI-MS.....	182
7 Kopplungstechniken	185
7.1 Gaschromatographie -Massenspektrometrie.....	185

7.2 Flüssigchromatographie - Massenspektrometrie.....	187
7.2.1 LC-Thermospray-MS.....	188
7.2.2 LC-Atmosphärendruck-MS.....	190
7.2.3 LC-Fast-Atom-Bombardement-MS.....	192
7.2.4 LC-Electrospray-MS.....	193
7.2.5 LC-Particle-Beam-MS.....	194
7.2.6 u-LC-Direkteinlaß-MS.....	195
8 Applikationen kleiner Biosubstanzen.....	199
8.1 Glutathion und Metallothioneine in toxischen und antitoxischen Prozessen.....	200
8.1.1 Metallothioneine.....	200
8.1.2 Phytochelatine.....	202
8.1.3 Glutathion und Thiolspecies.....	203
8.1.4 Derivatisierung und Detektion von Thiolspecies.....	205
8.1.4.1 Ellman's-Reagenz.....	206
8.1.4.2 Sanger's Reagenz.....	206
8.1.4.3 Substituierte Maleinimide.....	206
8.1.4.4 Monobrombiman.....	207
8.1.4.5 o-Phthalaldehyd.....	207
8.1.4.6 Elektrochemische Detektion.....	208
8.1.5 HPLC von Thiolen und Disulfiden.....	209
8.1.5.1 Kovalente Chromatographie.....	209
8.1.5.2 „Saure“ Reversed-Phase-HPLC.....	211
8.1.5.3 Electrospray-MS von Glutathion und Metaboliten.....	213
8.1.5.4 Analyse biologischer Matrices.....	214
8.1.6 Kapillarelektrophorese von Thiolen und Disulfiden.....	216
8.1.7 Kapillarelektrophorese von Phytochelatinen.....	218
8.2 Nucleobasen und Nucleoside in Zellen und Geweben.....	221
8.2.1 Reversed-Phase- und Ionenpaarchromatographie.....	222
8.2.2 Kapillarelektrophorese.....	224
8.3 Kohlenhydrate in Hydrolysaten und Lebensmitteln.....	225
8.3.1 Chromatographie an Aminophasen.....	225
8.3.2 HPAEC-PAD-Technik.....	229
8.3.3 Kapillarelektrophorese.....	231
8.4 Säuren in biotechnologischen Prozessen und Produkten.....	232
8.4.1 Organische Säuren in Fermentationsmedien.....	232
8.4.1.1 Ionenaustauschchromatographie von organischen Säuren.....	234
8.4.1.2 Ionenausschlußchromatographie von niederen organischen Säuren.....	236
8.4.2 Fettsäuren in Hefen und Bakterien.....	238
8.4.2.1 Modifizierungen und Kapillargaschromatographie.....	240
8.4.2.2 Kapillargaschromatographie - Massenspektrometrie.....	243

9 Applikationen großer Biomoleküle	247
9.1 Enzyme von thermophilen Mikroorganismen.....	247
9.1.1 Isolierung der Enzymfraktionen.....	247
9.1.2 Biochromatographie.....	249
9.2 Nucleotide in Geweben und von DNA-Spaltprodukten.....	253
9.2.1 Ionenpaarchromatographie.....	254
9.2.2 Kapillargelelektrophorese von DNA-Fragmenten.....	256
9.3 Glycan-Strukturen von Glycoproteinen.....	260
9.3.1 Profilanalysen der Glycane.....	262
9.3.1.1 Monosaccharid-Mapping mittels HPAEC-PAD.....	262
9.3.1.2 W-Glycan-Trennungen mit speziellen HPLC-Methoden.....	263
9.3.2 Strukturanalysen der Glycane.....	264
9.3.2.1 GC-MS und Methylierungsanalyse.....	265
9.3.2.2 Fast-Atom-Bombardement.....	266
9.3.3.3 LC-Electrospray-MS.....	267
9.3.3.4 MALDI-TOF-MS.....	268
9.3.2.5 MALDI-PSD-TOF-MS.....	269
9.3.2.5'H-NMR.....	274
9.4 Phospholipide in biologischen Extrakten.....	276
9.4.1 Flüssigchromatographie.....	276
9.4.2 NMR-Spektroskopie.....	279
10 Literaturverzeichnis	285
zu Kapitel 2:.....	285
zu Kapitel 3:.....	285
zu Kapitel 4:.....	286
zu Kapitel 5:.....	289
zu Kapitel 6:.....	290
zu Kapitel 7:.....	292
zu Abschnitt 8.1.....	293
zu Abschnitt 8.2:.....	296
zu Abschnitt 8.3.....	297
zu Abschnitt 8.4.....	298
zu Abschnitt 9.1.....	299
zu Abschnitt 9.2.....	301
zu Abschnitt 9.3.....	303
zu Abschnitt 9.4.....	305
Sachwortverzeichnis	307