

Fluoreszenz:

a) Erläutern Sie kurz, warum viele Biomoleküle so praktisch kaum messbar sind. Wie gelingt es dennoch, mit Fluoreszenz gut zu mikroskopieren? Warum wird trotz UV-Anregung dann oft im sichtbaren Bereich detektiert? Was ist die theoretische Besonderheit für Letzteres?

b) Warum ist die Empfindlichkeit sowie die Selektivität bei Fluoreszenz und UV/Vis erheblich unterschiedlich? Schildern Sie eine Anwendung für die Biotechnologie, außer der Mikroskopie, bei der einer dieser Vorteile besonders ausgenutzt wird. (etwa 13 min)

a) Biomoleküle nicht fluoreszenzaktiv (\rightarrow zu wenig chromophore Gruppen)

\rightarrow mit Fluoreszenzfarbstoff markieren, dann können sichtbar

weil durch Stokes Shift längere Wellenlängen emittiert werden.

Das liegt an dem angeregten Licht (-höhere Wellenlänge und geringere Energie lost)

Besonderheit:

(Absorption von Photonen und darauf folgende Energieabgabe)

Emission von Licht mit höherer Wellenlänge (niedriger Energie)

\rightarrow ermöglicht Trennung von Emission und Anregung und somit

Detektion bei einer anderen Wellenlänge

b) Bei Fluoreszenz wird geringerer Hintergrund rauschen

Selektiv \rightarrow Markierung, \rightarrow geringe Nachweisgrenzen

Bsp.: FACS, Fluoreszenzdetektor bei DNA-Sequenzierung

26. Erläutern Sie die Zellsortierung mit Hilfe von Fluoreszenz.

FACS : $\hat{=}$ Fluoreszenz - activated - cell sorting

\rightarrow Sortierung von Zellen über statische Aufladung je nach Fluoreszenz Signal und Anheftung im el. Feld

2. a) Benennen Sie die wesentlichen Komponenten für den Aufbau eines Fluoreszenzphotometers. Beschreiben Sie kurz das Messprinzip und heben Sie einen prinzipielle Unterschied gegenüber einem UV-Detektor hervor (anhand von z.B. Aufbau/Messung/Sensitivität/Spezifität)?

b) Warum wird Fluoreszenz so gerne in der Bioanalytik eingesetzt? Ein rekombinantes Protein soll über Fluoreszenz quantifiziert werden, was müssten Sie für die Vorbereitung einer solchen Messung unternehmen bzw. beachten?

- a)
- Laser / LED
 - Probe
 - Monochromator
 - Detektor

Prinzip: Substanz (Probe) absorbiert Licht, dann Stokes-Shift
 ⇒ Schwingungsrelaxation → Verschiebung der emittierten Wellenlänge
 → höhere Wellenlänge

Das emittierte Licht wird im 90° Winkel zur Anregungswellenlänge gemessen um zu verhindern, dass diese mitgemessen wird. Zu. Probe und Detektor befinden sich im Monochromator.

	Fluoreszenz	UV
Aufbau:	Detektor 90° zur Lichtquelle Monochromator nach Probe Anregung im geringen λ -Bereich	Detektor in einer Linie mit Lichtquelle kein Monochromator nach Probe hoher λ -Spektrum für Anregung
Messung	Emission	Absorption
Sensitivität	>	
Spezifität	>	

b) Fluoreszenz in Bioanalytik:

- hohe Empfindlichkeit
- selektive Detektion
 - ↳ selektiv f. bestimmte Mol/ Substanzen
 - ↳ Sonden spec. f. Zielmol.
- vielfältige Anwendung
- Bildgebung → Fluoreszenzmikroskopie

Vorbereitung f. Quantifizierung v. sekund. Protein

- wenn nicht autofluoreszent
 - ↳ Markierung mit Sonde
 - intern
 - ↳ Einbau v. z.B. GFP
 - extern
 - chemisch
 - ↳ Proteine mit Dansylchlorid oder Fluoresceinisothiocyanat (FITC)