



RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM

Fakultät für Biologie

Titel der Lehrinheit (LE)

Modulpraktika Biochemie im Schwerpunkt
Proteine: Struktur und biologische Funktion –
Genklonierung, -Expression und -Analyse

Bezeichnung der LE

Nr. des
Vorl.-Verzeichnis

LE-Kreditpunkte

4

Fachsemester

7

Dauer :

2 Wochen

SWS

5

Dozenten

M. Lübben

Prüfer

M. Lübben, J. Schlitter

Studiengänge:

Pflicht-LE für:

M. Sc. in Biochemie

Freiwillige LE für:

M. Sc. in Chemie

Zielsetzungen

Der Student soll mit Techniken zur Isolation und funktionellen Analyse von Nukleinsäuren und ihrer gentechnischen Manipulation bis zur Genexpression vertraut gemacht werden.

Themenverzeichnis

Klonierung und funktionelle Expression von mikrobiellen, für ATPasen kodierende Gene:
Isolation von Nukleinsäuren, Polymerase-Kettenreaktion, Restriktion, Ligation, Transformation von *Escherichia coli*, DNA-Sequenzierung, Expressionschecks

Lehrmethoden:

Praktikum

2 Wochen ganztägiges Praktikum

Seminar

3 halbe Tage zu Beginn des Praktikums

Überprüfung des Lernfortschritts

Bearbeitung der praktischen Aufgaben und deren Protokollierung, aktive Teilnahme am Seminar

Leistungskontrolle

regelmäßiger Bericht an Prüfer nach Abschluss von Teilaufgaben, Versuchsprotokoll

Zusammenfassung der Lehrgegenstände

- a. Wissenschaftlicher Hintergrund über die Grundlagen der zu klonierenden und zu exprimierenden mikrobiellen Gene (ionentranslozierende ATPasen, metallbindende Chaperones) - vermittelt durch Literaturstudium und Diskussion mit Betreuern
- b. Sicherheitsbelehrung (allgemeine Laborpraxis, Arbeiten im gentechnischen Labor (S1))
- c. Versuchsstrategische und methodische Vorbesprechung (Prinzipien der zu erlernenden molekularbiologischen Verfahren)
- d. praktische Versuche:
 1. Bakterienanzucht (von verschiedenen Eubakterien bzw. Archaeen) zur Extraktion von genomischer DNA.
 2. Design von PCR Primern, Konstruktion des Expressionsplasmids durch virtuelles Klonieren am Computer
 3. Isolierung genomischer DNA als Template für PCR
 4. PCR, Restriktion, Ligation in Expressionsplasmid
 5. Transformation von *Escherichia coli*, Plattierung, Isolierung von Klonen
 6. Sequenzierung der Insert-DNA zwecks Verifikation der Klonierung
 7. Plasmidisolierung und Transformation des Expressionsstamms
 8. Versuche zur heterologen Expression, Induktion mit IPTG (Zellwachstum)
 9. Überprüfung der zellulären Lokalisation (Zellaufschluss, Minimembranpräparation; SDS-Gelelektrophorese des Homogenats und Nachweis des exprimierten Proteins durch Immunoblotting)
 10. Physiologische Tests: Messung der Schwermetall-Resistenz der Expressionsklone *in vivo*.

Der Inhalt dieses Forschungspraktikums ist nur exemplarisch; über die tatsächlich durchgeführten Experimente wird kurz vor dem Praktikum entschieden.