



RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM

Fakultät für Biologie

Titel der Lehrinheit (LE)

Modulpraktika Biochemie im Schwerpunkt
Proteine: Struktur und biologische Funktion –
Proteinisolierung 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, E. Hofmann

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 Proteinen vertraut gemacht werden.

Themenverzeichnis

Proteinisolation von löslichen Proteinen und Membranproteinen /Cu-Transport ATPase aus Mikroorganismen; Lipidrekonstitution, Aktivitätstest; Bindung von Substratanaloga

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 primär aktive Ionenpumpen wie Cu-Transport ATPase (physiologische und mechanistische Grundlagen vermittelt durch Literaturstudium und Diskussion mit Betreuern)
- b. Sicherheitsbelehrung (allgemeine Laborpraxis, Arbeiten im gentechnischen Labor (S1))
- c. Versuchsstrategische und methodische Vorbesprechung (Prinzipien der Bakterienfermentation, Proteinreinigung und proteinspezifischer Funktionstests)
- d. praktische Versuche:
 1. Bakterienanzucht (Heterologe Expression der membrangebundenen ATPase in *Escherichia coli*.)
 2. Zellaufschluss und Membranreinigung durch differentielle Zentrifugation
 3. Proteinquantifizierung der Membran, Extraktion der membranintegralen ATPase mit Detergenzien
 4. Säulenchromatographie (1. Schritt: Ni-Affinitätschromatographie der oligohistidin-modifizierten ATPase sowie 2. Schritt: Anionentauscher-Chromatographie (Mono Q); Einsatz von modernen FPLC und HPLC-Anlagen)
 5. Proteinchemische Charakterisierung (1. SDS-Gelelektrophorese, 2. proteinspezifischer Nachweis mittels Western-blot)
 6. Aktivitätstest mittels des natürlichen Substrats ATP durch Phosphatbestimmung und spektroskopisch mit dem chromophoren Substrat p-Nitrophenylphosphat
 7. Rekonstitution in Phospholipidmembranen, Effekte auf biologische Aktivität der ATPase
 8. Messung der Ligandenbindung über Proteinfluoreszenz und mittels fluoreszenzmarkierter Substratanaloga (Aufnahme von Excitations- und Emissionsspektren; Titrationen zur Bestimmung von Bindungsplatzzahl und der thermodynamischen Dissoziationskonstante); Bestimmung von Dissoziationsraten durch Ligandenverdrängung
 9. Optional können die Experimente (bis auf 3. und 7.) auch mit der heterolog exprimierten katalytischen Domäne durchgeführt werden

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