



# 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.