

# Lernfragen zum F1 Praktikum Biotechnologie

© Andrea Thorn 02/2006 (andrea.thorn@web.de)

*Diese Fragen dienen der Wiederholung des Stoffes der Versuche und Seminare zum Praktikum. In einigen Bereichen sprengen sie den Bereich dessen, was im Kolloq gefragt wird (!); während es im Biologischen Defizite gibt, wie ich selbst während meines Kolloquiums erfahren musste. Ich hoffe, dass sie eine Hilfe sind! Viel Erfolg, Andrea.*

## Versuch A1

- Was ist ein Überexpressionssystem?
- Was ist ein tag?
- Was ist der Unterschied zwischen Klonen und Klonieren?
- Ist PCR eine in vivo Technik?
- Wie sollte ein Primer aufgebaut sein?
- Welche Bedingungen muss oder sollte er erfüllen?
- Warum ist die Annealing-Temperatur wichtig?
- Aus welchen Zyklen ist eine PCR aufgebaut und bei welchen Temperaturen (ungefähr) laufen diese ab?
- Welche Bedingung muss die zur PCR eingesetzte Polymerase zu allererst erfüllen?
- Wie ist die Formel zur Berechnung der Schmelztemperatur eines Primers?
- Wenn die Schmelztemperaturen des Primers bekannt sind, wie wird dann die zu programmierende Annealingtemperatur bestimmt?
- Welchen GC-Gehalt sollte ein Primer haben?
- Wie unterscheiden sich der erste und der letzte PCR-Schritt von allen anderen?
- Welche drei Typen Restriktionsendonuklease werden unterschieden?
- Welcher Typ Restriktionsendonuklease wurde in Versuch A1 verwendet. Warum?
- Was ist ein DNA-Palindrom?
- Wie spalten Restriktionsendonukleasen an Palindromen? (Reaktionstyp, wo?)
- Wozu dient Agarose-Gelelektrophorese? Wie groß oder klein sollte die DNA sein?
- Wie wird DNA bei der Agarose-Gelelektrophorese genau detektiert?
- Welche Enzyme verbinden DNA-Fragmente? Welches haben wir verwendet?
- Zwischen welchen funktionellen Gruppen kann ligiert werden?
- Was ist Transformation
- Was ist die Kompetenz eines Bakterienstammes? Wovon ist sie abhängig?
- Wie wird eine Transformation durchgeführt?
- Welche Eigenschaften sollte das in A1 hergestellte Plasmid haben?
- Warum werden zwei verschiedene Restriktionsendonukleasen verwendet?
- Was kommt in einen PCR-Ansatz?
- Wie kann DNA gereinigt werden (3 Methoden)?
- Was ist ein chaotropes Salz?
- Welches Salz verstärkt die hydrophoben WW zwischen Proteinen?
- Nennen Sie ein Beispiel für ein chaotropes Salz? Würden Sie dieses Salz zum Auskristallisieren eines Proteins verwenden? Warum?
- Was ist die Hofmeisterreihe? Wo steht da was?
- Was muss unbedingt in einen Ligationsansatz?
- Wie funktioniert Colony-PCR?
- Was ist bei der Wahl geeigneter Restriktionsenzyme für eine Klonierung zu beachten?
- Worin unterscheiden sich thermostabile Polymerasen wie Taq- oder Pfu-Polymerasen? Warum ist der Einsatz von Taq-Polymerase für eine präparative PCR eigentlich nicht die beste Wahl?
- Was ist eine Exonukleaseaktivität?

- Was versteht man unter Dephosphorylierung eines geschnittenen Vektors? Welchem Zweck dient dieser Zwischenschritt?
- Was ist und wozu dient SAP?
- Wie funktioniert Ligation?
- Warum braucht Ligase ATP, Taq-Polymerase aber nicht?
- Der Vektor ist am 5'-Ende desphosphoryliert, wenn die Ligase zugegeben wird. Warum werden aber 3'- und 5'-Ende verbunden?
- Skizziere die katalysierte Ligationsreaktion!
- Welche Konformationen können bei Plasmiden auftreten? Wie lassen sich diese unterscheiden?
- Warum ist es entscheidend für den Klonierungserfolg, dass der Vektor während des Restriktionsverdaus vollständig geschnitten wird? An welcher Stelle im Klonierungsschema würden selbst minimale Mengen ungeschnittenen Vektors ernste Probleme bereiten?
- Wie funktioniert „Blue/White-Screening“? Welche Voraussetzungen müssen dafür gegeben sein (Konstruktion des Plasmids/Bakterienstamms)?
- Welche Methoden könnten zusätzlich zur Colony-PCR durchgeführt werden, um den Erfolg der Klonierung abzusichern? Wie funktionieren diese Methoden? Welche Methode würden Sie als die zuverlässigste bewerten?
- Welche genetischen Eigenschaften sollten E.coli Stämme, die bevorzugt für Klonierung bzw. Stammhaltung eines Plasmids eingesetzt werden, mitbringen?
- Wie ist der Tyro3-Rezeptor aufgebaut?
- Wo im Rezeptor befindet sich die Rezeptorbindestelle?
- Wie liegt der Rezeptor in Lösung, wie im Kristall vor? Auf welche zusätzliche Funktion des Rezeptors könnte daraus geschlossen werden?
- Wie wird die Länge der Schnittstelle im Primer bestimmt?
- Was muss man mit rekombinanten E. Coli Zellen machen, um Protein zu gewinnen, ohne Rückfaltung zu machen?

## Versuch A2

- Was wurde mit dem Versuch A2 bezweckt?
- Nenne fünf Gründe für die Bevorzugung von E. Coli bei einem biochemischen Experiment!
- Wie liegen überexprimierte Proteine aus E.Coli vor? Warum ist das vorteilhaft?
- Wie funktioniert die Herstellung radiomarkierter Proteine?
- Was ist pET? Wofür steht die Abkürzung?
- Welche Polymerase transkribiert bei pET-Verwendung die klonierte DNA?
- Wie kommt die RNA-Polymerase in die Zelle? Wie wird sie aktiviert?
- Was ist leaky expression? Welche Proteine können deswegen nicht gewonnen werden? Wie kann man das Problem lösen?
- Welche Proteine werden besonders oft in E.Coli fehlerhaft gefaltet? Warum?
- Wie entstehen Inclusion Bodies?
- Nenne drei Möglichkeiten, den Einschluss gebildeten Proteins in Inclusion Bodies zu verhindern!
- Wofür steht SDS-PAGE?
- Wieso können die tRNAs die Expression des Proteins beeinflussen? Warum ist das ein Problem?
- Wie funktioniert ein Expressionstest?
- Womit wurde die Expression induziert?
- Warum wurden Proben entnommen, bevor die Expression induziert wurde?
- Welche 4 Expressionsproben wurden von jeder Kultur entnommen?
- Welche Unterschiede gibt es zwischen SDS-PAGE und nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese?
- Warum kann man in A2 Teilversuch 4 Tyro3 im unlöslichen Teil des Proteinaufschlusses finden?
- Welche drei Vorteile hat eine cytoplasmatische Proteinexpression?
- Welche drei Vorteile hat eine Akkumulation in Inclusion Bodies?
- Wieso werden manche Proteine in Insektenzellen exprimiert (3 Gründe)?
- Was sind Baculoviren?
- Was ist die N-end-rule?
- Was sollte die RNS nicht tun, wenn man draus ein Protein haben will?
- Welche vier Orte der möglichen Expression gibt es?

## Versuch B1

- Welche Gängigkeit hat eine Alphahelix?
- Welche Winkel werden mit Phi, Psi und Omega bezeichnet?
- Welchem Enantiomer gehören fast alle natürlichen Aminosäuren an?
- Zeichne schematisch eine L-Aminosäure!
- Welche 20 proteinogenen Aminosäuren gibt es? Zeichne fünf!
- Zwischen welchen Aminosäuren bilden sich WBBs in Faltblättern bzw. in Helices?
- Was ist eine Supersekundärstruktur?
- Was ist ein Rossmannmotiv?
- Worauf kann eine schon bekannte Supersekundärstruktur in einem bisher unbekannten Protein hindeuten?
- Was ist eine Domäne?
- Wie sieht eine typische Immunoglobulindomäne aus?
- Welche Arten von Symmetrie sind in Proteinen zu finden? Welche kommen nie vor?
- Welche sieben Holoedrien gibt es?
- Was ist eine Elementarzelle?
- Was ist eine asymmetrische Einheit?
- Wieviele Bravaisgittertypen gibt es?
- Was ist ein Bravaisgitter?
- Welche Symmetrieoperationstypen gibt es in Kristallgittern?
- Wie ist eine  $2_1$  Schraubenachse definiert?
- Was ist eine Raumgruppe?
- Wieviele Raumgruppen gibt es, in denen Proteine auskristallisieren können?
- Was versteht man unter einem Slab?
- Was ist ein Topologieplot?
- In welcher Richtung werden Proteine stets annotiert?
- Wodurch ist ein Loop charakterisiert?
- Was ist im Ramachandranplot entlang der x-, Was entlang der y-Achse aufgetragen?
- Skizzieren Sie die erlaubten Bereiche im Ramachandranplot?
- Wo liegen rechts- bzw. linksgängige Alphahelices, wo das Betafaltblatt?
- Warum besitzen  $\alpha$ -Helices einen Dipolcharakter?
- Was bedeuten die 3 und die 10 im Symbol  $3_{10}$ ?
- Was ist ein Twist?

## Versuch B2

- Welchen Solvensgehalt haben Proteinkristalle?
- Was ist die Mindestgröße für einen Proteinkristall?
- Wovon ist die Kristallisation eines Proteins abhängig?
- Tragen Sie in einem Diagramm Proteinkonzentration gegen Fällungsmittel den ungesättigten und den metastabilen Bereich an!  
Wie verläuft eine Proteinkristallisation?
- Beschreiben Sie vier Methoden zur Proteinkristallisation!
- Wie funktioniert die Ammoniumsulfatfällung?
- Wie sieht die Hofmeisterreihe für Anionen und wie für Kationen aus?
- Wo in der Hofmeisterreihe findet man chaotrope Salze?
- Wie werden Membranproteine kristallisiert?
- Welche Funktion hat Lysozym?
- Welche Reaktion wird von Lysozym katalysiert?
- Warum kann man annehmen, dass die Kristallstruktur eines Proteins der natürlichen entspricht?
- Welche Informationen über die Proteinstruktur werden warum nicht in der PDB mit angegeben?
- Wie werden Kristalle für das Diffraktometer präpariert?
- Warum sind Proteinkristalle unter einem Polarisationsfilter bunt?
- Was ist ein Gridscreen?
- Skizziere das Energieschema einer Kristallisation!

## Versuch C1 und C2

- Nach welchen Eigenschaften wird bei einer Ionenaustauschchromatographie getrennt, nach welchen bei Gelfiltration, nach was bei AC- bzw. HIC-Chromatographie?
- Skizziere diese vier Chromatographietypen und eventuell zugeführte Lösungen gegen die Zeit!
- Welche vier wichtigen Faktoren sind bei einem Proteintrennungsverfahren zu beachten?
- Wie funktioniert eine Proteinisolierung nach Affinität?
- Mit was würden Sie ein Vitamin, einen Rezeptor, eine RNA, einen virus oder ein Enzym binden?
- Wie funktioniert Ionenaustauschchromatographie?
- Wie lautet die Henderson-Hasselbach-Gleichung?
- Von welchen Faktoren ist die Auflösung einer Chromatographie abhängig?
- Was sind Osmolyte? Wie kann man sie auch bezeichnen?
- Welche Rückfaltungsmethoden kennen Sie?
- Was ist das Levinthalparadoxon und wie kann es erklärt werden?
- Wer hat wie bewiesen, dass die Information zur korrekten Faltung in der Primärstruktur begründet liegt?
- Nennen Sie zwei Krankheiten, die auf falsch gefalteten Proteinen beruhen!
- Mit welchen anderen Reaktionen konkurriert die Rückfaltungsreaktion?
- Welche Reagenzien werden zur Solubilisierung von Inclusion Bodies verwendet? Nennen Sie ein typisches!
- Nennen Sie fünf für die Rückfaltung kritische Reaktionsbedingungen!
- Nennen Sie die Nachteile von Verdünnung und Dialyse als Rückfaltungsmethoden!
- Wie kann eine on-column Rückfaltung aussehen?
- Was bedeutet maximale Auflösung bei minimaler Zonenbreite?
- Haben Anionenaustauscher oder Kationenaustauscher eine negative Oberflächenladung?
- Welche Chromatographiemethode ist die mildeste?
- Welche zwei Anwendungen der Gelfiltration werden unterschieden?
- Wie können Zellen aufgeschlossen werden?
- Wie wird das Protein aus den Inclusion Bodies gewonnen?
- Kann man den Dimerisierungsgrad eines Proteins durch Gelfiltration bestimmen? Warum ist das für Tyro3-D1D2 interessant?
- Was ist das schlimmste, was noch im Inclusion Body sein kann?
- Welche Eigenschaften der Mutante konnten im Versuch Analytische gelfiltration bewiesen werden?
- Wie funktioniert ein Zentrifugationskonzentrator?
- Wie kann man korrekt gefaltetes Protein leicht identifizieren?

## Versuch D1

- Wie entsteht Anodenstrahlung?
- Was ist der reziproke Raum?
- Wie funktioniert eine Fourieranalyse, wie eine Fouriersynthese?
- Was ist Compton-, was Thompson-Streuung? Welche wird in der Röntgenstrukturanalyse benutzt?
- Wie funktioniert Röntgenstrukturanalyse?
- Wie lautet die Bragg'sche Gleichung? Was bedeuten die Variablen?
- Wie hängen Strukturfaktor und Intensität der Streuwelle zusammen?
- Was passiert mit einer Fourierente, wenn ein Primärstrahlfänger benutzt wird?
- Nennen Sie vier Methoden, das Phasenproblem zu lösen!
- Was ist eine Differenzfourieranalyse?
- Was sind Selbst- was Crossvektoren?
- Was erhält man aus einer Pattersonfunktion?
- Wofür ist molekularer Ersatz geeignet, wofür nicht?
- Wie läuft eine Phasenbestimmung mit Molekularem Ersatz ab?
- Was ist ein Temperaturfaktor? Was gibt er an? Wie wird er noch genannt?
- Wie sieht ein Verfeinerungszyklus aus?
- Was passiert bei der Verfeinerung?
- Warum gibt es in der Röntgenstrukturanalyse keine anisotrope Verfeinerung?
- Was unterscheidet Constraints und Restraints?
- Skizzieren Sie den R-Faktor gegen die Verfeinerungszyklen! Welche signifikanten Bereiche gibt es?
- Welche Möglichkeiten zur Validierung gibt es?
- Wie unterscheiden sich  $R_{\text{cryst}}$  und  $R_{\text{free}}$ ?
- Bei welcher Auflösung kann man Wassermoleküle sinnvoll platzieren? Ab wo startet die atomare Auflösung?
- Welche Temperaturfaktoren sind akzeptabel? Welche Einheit hat der B-Faktor?
- Was ist ein Spinübergang? Wie kann er angeregt werden? Welche drei Faktoren bestimmen die Gestalt der NMR-Peaks?
- Was ist Fourier Impulse Detection?
- Was macht man, um NMR-Spektren vergleichen zu können (Zwei Dinge)?
- Findet man wenig abgeschirmte Kerne im hohen Feld?
- Was ist Spinkopplung?
- Was ist NOE?
- Was ist NOESY, was COSY?
- Wie kann man die Qualität eines Protein-NMRs bestimmen?
- Was ist der wichtigste Unterschied zwischen NMR- und Röntgenstrukturen?
- Was ist an Protein-NMR vorteilhaft, was nachteilhaft?
- Welche Prozesse lassen sich mit NMR beobachten?
- Wie wirkt es sich aus, wenn ein Teil der Reflexe nicht gemessen werden?
- Was ist MIR und was unterscheidet MIR und MAD?
- Warum sollten die Bindungslängen in einer Strukturlösung mit Sollwerten abgeglichen werden?
- Notieren Sie die Anzahl der Reflexe und die Auflösung des Kristalls! Was versteht man unter „unique reflections“?
- Was katalysieren Nitrogenasen?
- Wie sind Nitrogenasen aufgebaut?

## Versuch D2

- Was ist ein Alignment?
- Welche drei Ergebnisse werden für ein Alignment unterschieden?
- Wie ist eine Substitutionsmatrix aufgebaut?
- Was ist ein globales Alignment?
- Wie kann mit einer Substitutionsmatrix ein Alignment gemacht werden?
- Wie werden Alignments in Datenbanken gemacht?
- Welche zwei Methoden gibt es zur Berechnung von Proteinstrukturen?
- Welche Sekundärstrukturen sind schwer vorherzusagen?
- Wie können die Aminosäurereste in ihrer Position berechnet werden?
- Worauf deutet Homologie hin?
- Was ist ein Hydrophobizitätsprofil? Wozu kann es dienen?
- Was ist stärker konserviert, Struktur oder Sequenz?