

RNA Analytik

Thorsten Enge

David Maruhn

27. Juni 2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
2	Materialien und Methoden	2
3	Durchführung	2
3.1	RNA-Isolation mittels Monarch [®] Total RNA Miniprep Kit (NEB)	2
3.2	cDNA-Synthese aus isolierter RNA	3
3.3	Quantifizierung durch qPCR (Real-Time PCR)	3
3.4	Analyse der Zielgene	4
4	Ergebnisse	4
5	Diskussion	10

1 Einleitung

Während bei der DNA-Analytik untersucht wird, ob eine bestimmte DNA-Sequenz auf dem Genom vorhanden ist, wird bei der RNA-Analytik untersucht, ob und wie stark ein bestimmtes Gen transkribiert wird. Das Vorhandensein eines Gens auf dem Genom bedeutet nicht zwangsläufig, dass dieses Gen auch transkribiert wird. Mechanismen wie die DNA-Methylierung, die Histonmodifikation, Transkriptionsfaktoren und Enhancer bzw. Silencer beeinflussen die Transkription eines Gens. Die durch die Analyse der RNA kann einerseits das Vorhandensein eines Gens auf dem Genom bestätigt werden, andererseits kann durch die quantifizierung Rückschlüsse auf die Transkriptionsrate gezogen werden und somit auf die Aktivität des Gens. Das nichtvorhandensein eines Transkripts bedeutet entweder das Fehlen des Gens auf dem Genom oder eine sehr geringe Transkriptionsrate.

2 Materialien und Methoden

Zellkulturen

Für die RNA-Isolation wurden die Zelllinien HEK293T und A375 verwendet. Beide Zellkulturen sind immortale humane Zelllinien.

- HEK293T sind Zellen, die aus der Niere eines Embryos gewonnen wurden. Sie sind durch die Transformation mit dem SV40-T-Antigen immortalisiert worden.
- A375-Zellen stammen aus einem Melanom, sind sie von natur aus immortalisiert.

Genes of Interest

Die Gene of Interest sind die Gene, die in dieser Arbeit quantifiziert werden sollen. In diesem Fall sind es die Gene GAPDH und Beta-Actin.

- GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) katalysiert die Oxidation von Glyceraldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycolat im Glykolyseweg.



- Beta-Actin wird in der qPCR als Referenzgen verwendet, da es in allen Zellen in gleicher Menge vorhanden ist und somit als Kontrollgen dient.

3 Durchführung

Die RNA wird aus zwei unterschiedlichen Zelllinien isoliert und anschließend mittels einer reverse Transkription in cDNA transkribiert. Die cDNA wird dann mittels qPCR quantifiziert.

3.1 RNA-Isolation mittels Monarch[®] Total RNA Miniprep Kit (NEB)

- Lysat erstellen
- gDNA entfernen
- RNA isolieren und Nebenprodukte entfernen, unter Nutzung von Ethanolpräzipitation, um die Haftung der RNA zu erleichtern.
- DNase 1 zerstört Reste der DNA
- Elution RNA in nukleasefreiem Wasser

RNA-Isolation

In diesem Versuch wurde die RNA aus kultivierten humanen Zellen isoliert. Zu beachten sind die sorgfältige Reinigung von allen Oberflächen und Geräten mit 70%igem Alkohol, um Verunreinigungen mit Nukleasen zu vermeiden. Aus gleichem Grund ist es sinnvoll, stets mit Handschuhen zu arbeiten. Dafür wurden zunächst die tiefgefrorenen Zellpellets der kultivierten Zellen aufgetaut, bei 4 °C für 2 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und durch Zugabe von 800 µl des Lysepuffers in Lysat überführt. Durch die Lyse werden die Zellen aufgebrochen und der Zellinhalt für die weitere Prozessierung zugänglich gemacht. Im nächsten Schritt wurde aus dem Lysat die gDNA, die genomic DNA, durch Waschung über einer Removal Column entfernt. Hierfür wurden 800 µl Lysat in das gDNA Removal Column überführt und für 1 Minute bei 10.000 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die Column macht sich die strukturellen Unterschiede der DNA und RNA zunutze, um die DNA zu fixieren. Der flüssige Durchsatz wurde nach Entfernen und Entsorgung der gDNA Removal Column im Verhältnis 1:1 mit Ethanol ($\geq 95\%$) gemischt. Die Mischung wurde in mehreren Durchgängen in die RNA Purification Column überführt und für 1 Minute, 10.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Durchsatz wurde nach jedem Durchgang verworfen. Der Prozess wurde wiederholt, bis die Mischung einmal komplett durch die RNA Removal Column zentrifugiert wurde. Anschließend wurde die RNA Removal Column mit 500 µl RNA Wash Buffer benetzt und nochmals für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchsatz wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurde die RNA Removal Column in ein Tube überführt, das 75

µl DNase I Reaction Buffer enthält und die Matrix mit DNase I benetzt. Das Tube wurde 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden 500 µl Wash Buffer auf die Säule pipettiert, 1 Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 500 µl Priming Buffer auf die Säule pipettiert, 1 Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte eine Waschung mit 500 µl Wash Buffer und 1 Minute Zentrifugation. Nach Verwerfen des Überstands wurde nochmals mit 500 µl Wash Buffer auf die Säule pipettiert, 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Säule wurde in ein nukleasefreies Tube überführt. Es folgte die Elution der RNA, indem 50 µl nukleasefreies H₂O auf die Matrix der Säule pipettiert und 1 Minute zentrifugiert wurde. Die genaue Vorgehensweise ist der Anleitung des Monarch Total RNA Miniprep Kit (NEB) zu entnehmen.

Spektroskopie zur Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration

Dieser Abschnitt findet statt, um die Qualität der Aufbereitung der RNA aus den Zellpellets zu bewerten. Hierfür wurde 1 µl der Probe vermessen. Ziel war es, das Verhältnis der Absorption der Wellenlänge 260/280 [nm] zu überprüfen. Der experimentelle Schwellwert für eine weiterverwendbare RNA-Konzentration in der Probe ist ca. 2,0. Die Messung fand in einem Spektrophotometer DS-11+ -DeNovix statt. Benutzt wurde das RNA-Programm. Zunächst wird eine blank-messung durchgeführt, um dem Spektrophotometer einen Bezugsrahmen für folgende Messungen zu geben. Dies erfolgt durch die Messung 1 µl nukleasefreies H₂O. Die Messung erfolgte über die Mikrovolumenabsorptionseinheit. Nach der Eichung des Referenzrahmens folgte die Messung der einzelnen Proben. Stets mit 1 µl Probe auf der Mikrovolumenabsorptionseinheit, die nach jeder Messung mit nukleasefreiem H₂O gereinigt wurde.

3.2 cDNA-Synthese aus isolierter RNA

- Mischen der Komponenten in spezifischer Reihenfolge
- Inkubation

Reverse Transkription - cDNA-Synthese aus isolierter RNA

Zunächst wurde ein Heizblock TS pro - CellMedia auf 25 °C, 5 Minuten und nicht schüttelnd voreingestellt. Der Puffer, dNTPs, Random Primer Mix und RNA wurden auf Eis aufgetaut. RNase Inhibitor und M-MuLV Reverse Transkriptase wurden bei -20 °C gelagert. Für die RT-PCR wurde ein Reaktionsvolumen von 20 µl festgelegt.

Komponenten	Volumen
Random Primer Mix	2 µl
10X M-MuLV RT Puffer	2 µl
10 mM dNTP	1 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0.2 µl
M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
RNA (5 µg)	Probenabhängige Konzentration
Nukleasefreies H ₂ O	Bis 20 µl auffüllen

Tabelle 1: Komponenten für die cDNA-Synthese

Die angegebenen Komponenten wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gefüllt und abzentrifugiert. Abschließend wurde die Inkubation im Heizblock vorgenommen. Diese erfolgte in drei Schritten:

Zeit	Temperatur
5 Minuten	25 °C
60 Minuten	42 °C
20 Minuten	65 °C

Tabelle 2: Inkubationszeiten und Temperaturen

3.3 Quantifizierung durch qPCR (Real-Time PCR)

- 3 Mastermixe erstellen (je Primer-Paar)
- PCR im Cycler

Quantifizierung durch qPCR

Zur Untersuchung von drei Primern wurde jeweils ein Master Mix mit 80 µl Reaktionsvolumen für eine Messung, eine Zweitmessung und eine NTC in 20 µl vorbereitet. Jeder Master Mix enthielt pro Reaktion (20 µl) 10 µl 2X Biozym HRM Mix, 0.4 µl 10 µM Primer forward, 0.4 µl 10 µM Primer reverse, 8.2 µl nukleasefreies H₂O und 1 µl cDNA oder nukleasefreies H₂O für die NTC. Die Master Mixe wurden in PCR-Tubes transferiert. Die cDNA und das alternative H₂O wurden als letztes pipettiert. Anschließend wurden die PCR-Tubes verschlossen und auf Eis gelegt. Die Proben wurden in einem Roche Light Cycler 96 mit folgendem Programm analysiert:

Cycles	Step	Temp [°C]	Time [sec]
1	Preincubation	95	120
40	2 Step Amplification	95	5
		65	30
1	High Resolution Melting	95	60
		40	60
		65	1
		97	1
1	Cooling	37	30

Tabelle 3: PCR-Zyklusprogramm

Natürlich, hier ist der überarbeitete Abschnitt:

3.4 Analyse der Zielgene

Um die qPCR-Ergebnisse korrekt interpretieren zu können, wurden zunächst die Transkriptvarianten für GAPDH und Beta-Actin im RefSeq der NCBI-Datenbank identifiziert. Anschließend wurden die Primersequenzen mit den Sequenzen der verschiedenen Transkriptvarianten verglichen, um potenzielle Unterschiede in der Affinität der Primer zu den verschiedenen Transkripten zu ermitteln. Diese Analyse wurde mithilfe eines Python-Skripts durchgeführt.

4 Ergebnisse

Analyse der Zielgene

Gen	Transkriptvariante	mRNA	Amplifikat ohne Primer	Amplifikat
GAPDH.1	Variant 7	1231	113	154
	Variant 2	1386	Forward Primer nicht in Sequenz	
	Variant 3	1377	167	208
	Variant 4	1525	167	208
	Variant 1	1285	167	208
	Variant 6 (non-coding)	763	167	208
GAPDH.2	Variant 7	1231	221	269
	Variant 2	1386	221	269
	Variant 3	1377	221	269
	Variant 4	1525	221	269
	Variant 1	1285	221	269
	Variant 6 (non-coding)	763	Forward und Reverse Primer nicht in Sequenz	
Beta-Actin		1812	339	385

Tabelle 4: Länge der Amplifikate in Basenpaaren (bp): 3. Spalte länge der mRNA, 4. Spalte länge des Amplifikats ohne Primer, 5. Spalte länge des Amplifikats mit Primer (Ergebnisse der Analyse der Zielgene mit Python-Skript)

Das GAPDH Gen besitzt zehn Exons [2], durch alternative Splicing entstehen sechs verschiedene Transkriptvarianten. Die Transkriptvarianten 1, 2, 3, 4 und 7 kodieren für das Protein, wohingegen die Transkriptvariante 6 nicht kodiert. Der GAPDH.1 Primer bindet an die Transkriptvarianten 1, 3, 4, 6 und 7, wohingegen der GAPDH.2 Primer an die Transkriptvarianten 1, 2, 3, 4 und 7 bindet.

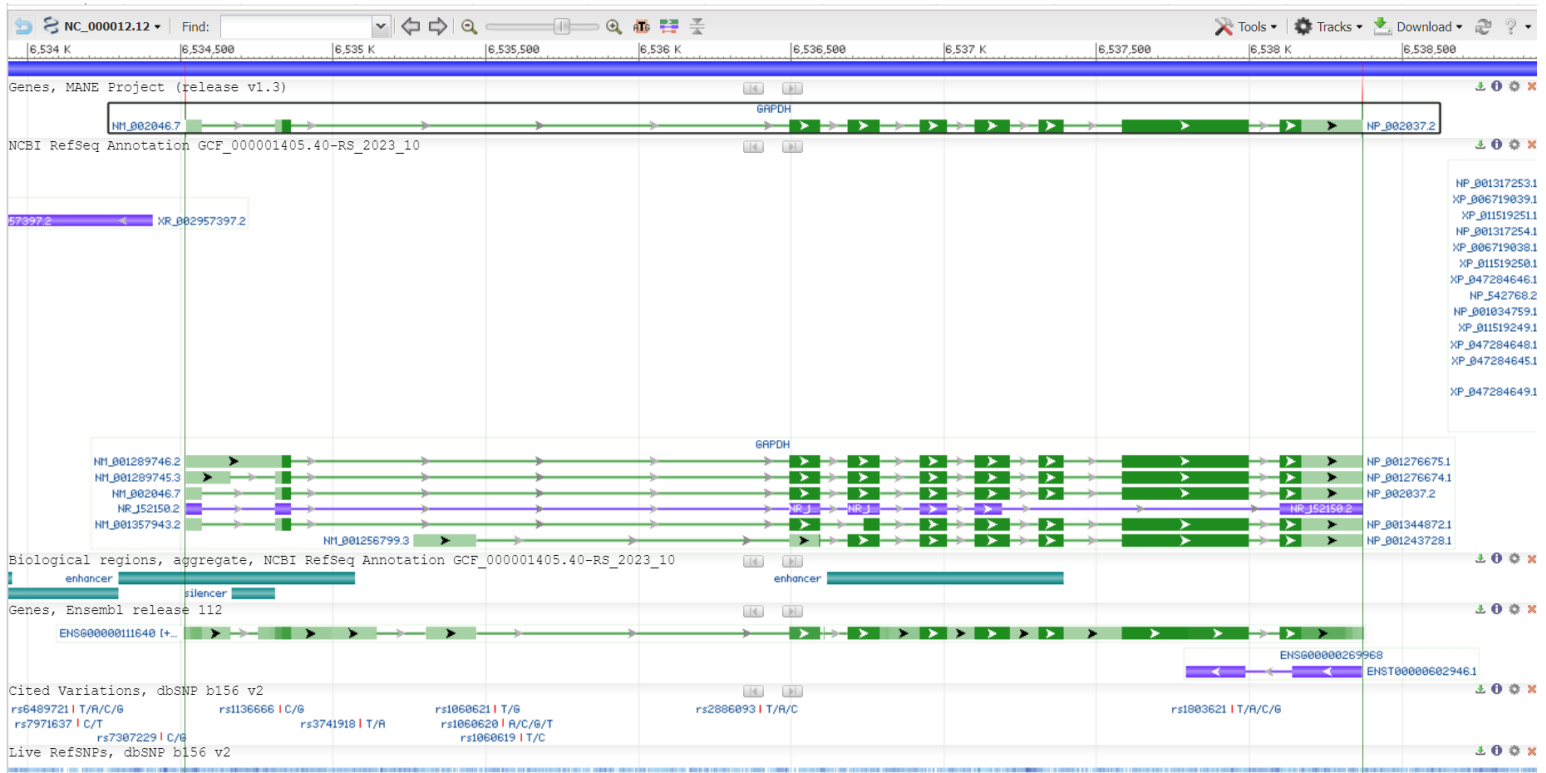


Abbildung 1: Transkriptvarianten und Exons des GAPDH Gens [1]

Spektroskopie zur Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration

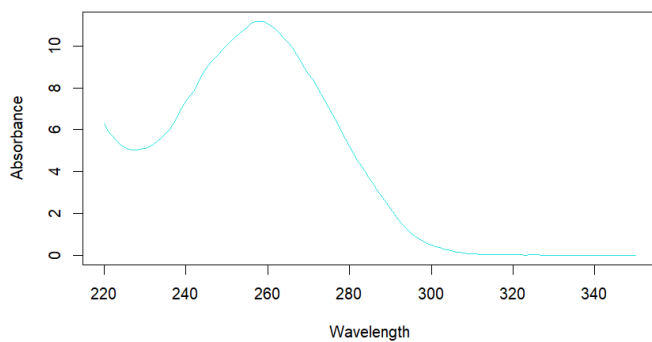
Sample name	Conc. (ng/uL)	260/280[nm]	260/230[nm]
HEK293T	115.449	2.098	2.069
HEK293T	123.755	2.092	1.889
A375	442.625	2.119	2.164
A375	444.200	2.116	2.189
SAAA	174.067	2.128	1.982
SAAA	162.606	2.125	1.987
JEEE	257.267	2.112	2.084
JEEE	253.345	2.133	2.078

Tabelle 5: Verhältnis der Absorption der Wellenlänge 260/280 [nm] und 260/230 [nm] der Proben

Die Reinheit der RNA wird durch die 260/280- und 260/230-Verhältnisse bestimmt. Ein ideales 260/280-Verhältnis für RNA liegt bei etwa 2.0, was auf eine hohe Reinheit hinweist. Ein 260/230-Verhältnis sollte typischerweise zwischen 2.0 und 2.2 liegen, was auf das Fehlen von Verunreinigungen wie EDTA, Kohlenhydraten oder Phenolen hinweist [3, 4].

Interpretation der Ergebnisse:

A375



HEK293T

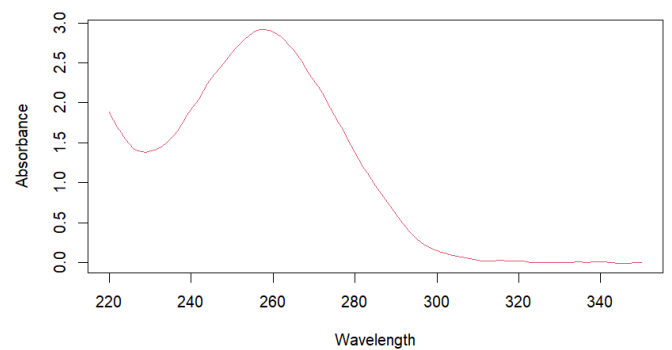


Abbildung 2: Absorptionsspektrum der A375-Proben

Abbildung 3: Absorptionsspektrum der HEK293T-Proben

- **HEK293T:**

- Beide Proben zeigen ein 260/280-Verhältnis von etwa 2.09, was auf eine hohe Reinheit der RNA hinweist.
- Das 260/230-Verhältnis der ersten Probe (2.069) liegt im idealen Bereich, während das Verhältnis der zweiten Probe (1.889) leicht unter dem idealen Bereich liegt, was auf mögliche Kontaminationen hinweisen könnte.

- **A375:**

- Beide Proben haben ein 260/280-Verhältnis von etwa 2.12, was eine gute RNA-Reinheit anzeigt.
- Das 260/230-Verhältnis liegt für beide Proben (2.164 und 2.189) im idealen Bereich, was auf eine sehr hohe Reinheit der RNA ohne signifikante Verunreinigungen hinweist.

- **SAAA:**

- Beide Proben zeigen ein 260/280-Verhältnis von etwa 2.12, was auf eine hohe Reinheit hinweist.
- Die 260/230-Verhältnisse (1.982 und 1.987) sind leicht unter dem idealen Bereich, was auf geringe Verunreinigungen hindeuten könnte, jedoch immer noch akzeptabel ist.

- **JEEE:**

- Beide Proben zeigen ein 260/280-Verhältnis von etwa 2.12 bis 2.13, was auf eine hohe Reinheit hinweist.
- Das 260/230-Verhältnis (2.084 und 2.078) liegt im idealen Bereich, was auf eine hohe Reinheit der RNA hinweist.

Die meisten Proben zeigen 260/280- und 260/230-Verhältnisse, die nahe oder im idealen Bereich liegen, was auf eine hohe Reinheit der isolierten RNA hinweist. Einige leichte Abweichungen beim 260/230-Verhältnis könnten auf minimale Verunreinigungen hinweisen, die jedoch die Gesamtqualität der RNA nicht signifikant beeinträchtigen sollten.

Gel-Elektrophorese

Die Auswertung der Gel-Elektrophorese zeigt die Größe der PCR-Produkte der GAPDH- und Beta-Actin-Proben. Die Banden der PCR-Produkte werden mit einer DNA-Standardleiter verglichen, um die Größe der Amplifikate zu bestimmen. Die Bandenintensität gibt Aufschluss über die Menge des Amplifikats.

Lane	Band	Volume	Base Pairs (BP)	Zelllinie	Gen
2	1	191325.48	200	HEK293T	GAPDH.1
3	1	303756.77	194	HEK293T	GAPDH.1
5	1	360547.50	264	HEK293T	GAPDH.2
6	1	337464.61	270	HEK293T	GAPDH.2
13	1	76446.84	186	A375	GAPDH.1
14	1	48044.41	181	A375	GAPDH.1
15	1	163074.30	165	A375	GAPDH.1
18	1	91246.00	379	A375	GAPDH.2
18	2	176074.94	240	A375	GAPDH.2
19	1	124744.67	383	A375	GAPDH.2
19	2	6812.80	238	A375	GAPDH.2
19	3	139857.73	68	A375	GAPDH.2
21	1	44789.33	559	A375	beta-Actin
21	2	388194.00	329	A375	beta-Actin
22	1	81981.33	344	A375	beta-Actin
22	2	122827.16	71	A375	beta-Actin

Tabelle 6: Summary of Gel Electrophoresis Analysis with Lane, Band, Volume, Base Pairs, Zelllinie, and Gen

Band No	Base Pairs	Calib Vol(ug)
1	5000.000	134.12
2	4000.000	57.78
3	3000.000	101.87
4	2500.000	67.59
5	2000.000	49.40
6	1500.000	57.56
7	1000.000	68.32
8	900.000	80.24
9	800.000	156.12
10	700.000	110.37
11	600.000	106.42
12	500.000	134.47
13	400.000	77.76
14	300.000	34.73
15	200.000	20.93
16	150.000	8.85
17	100.000	1.37

Tabelle 7: Ladder Data

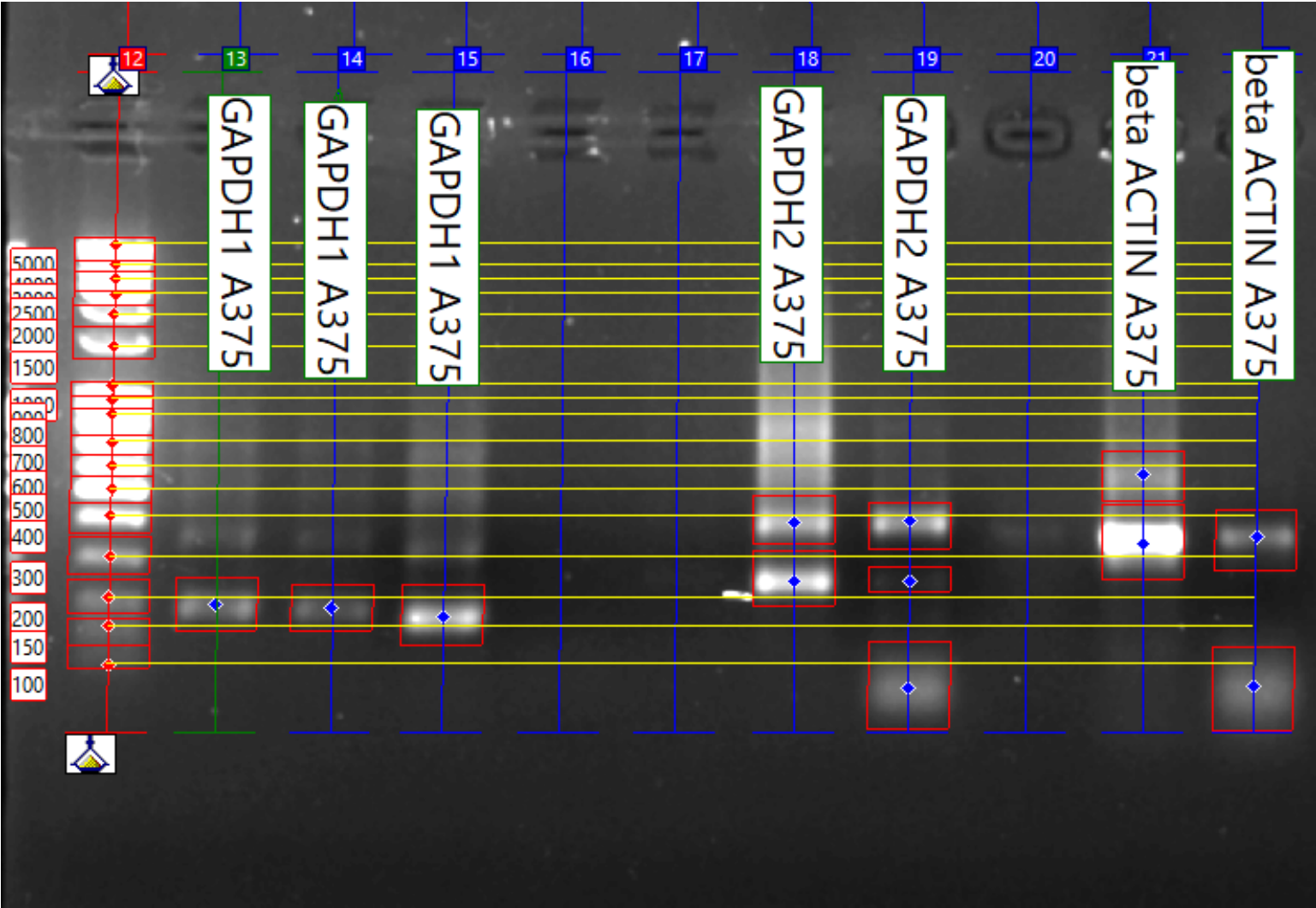


Abbildung 4: Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte der A375-Proben

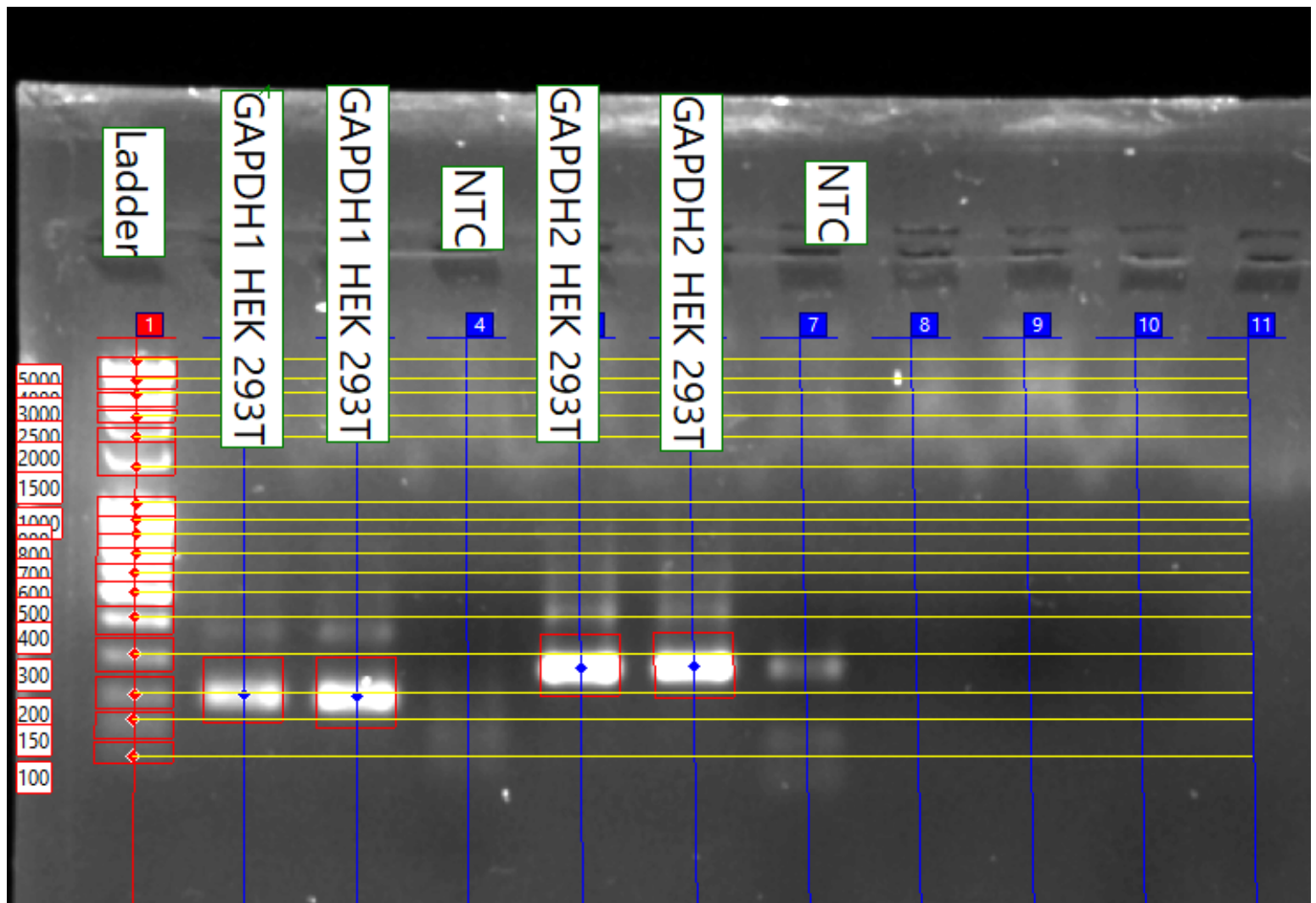


Abbildung 5: Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte der HEK293T-Proben

High Resolution Melting (HRM) Analyse

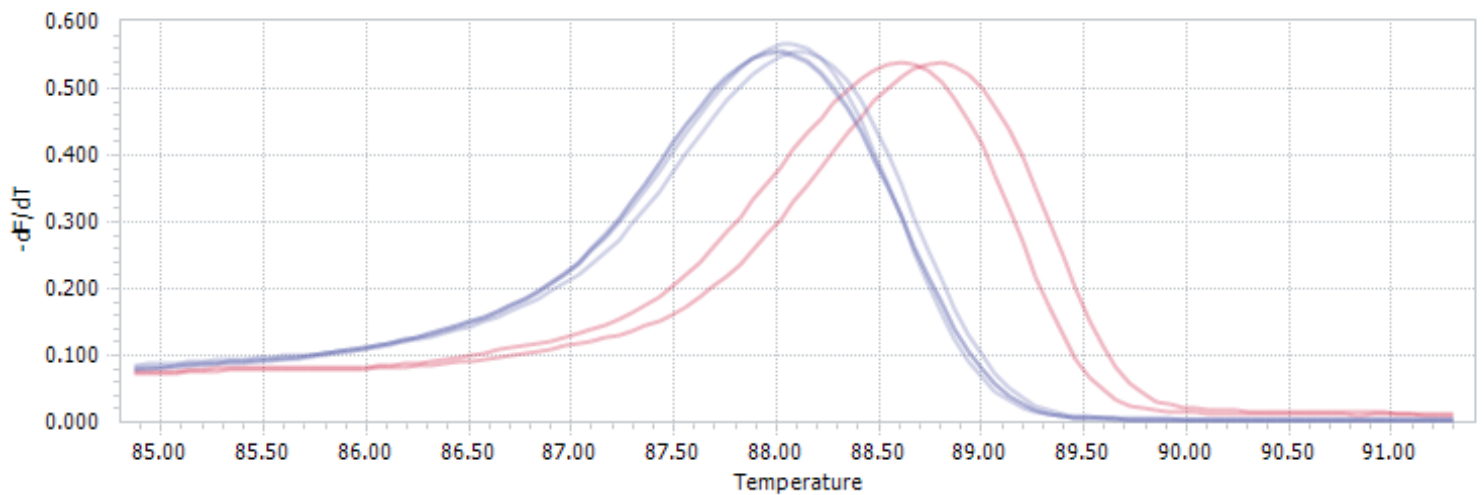
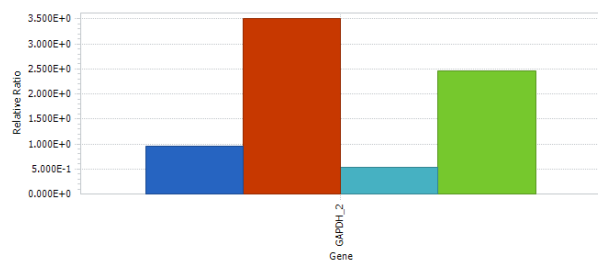
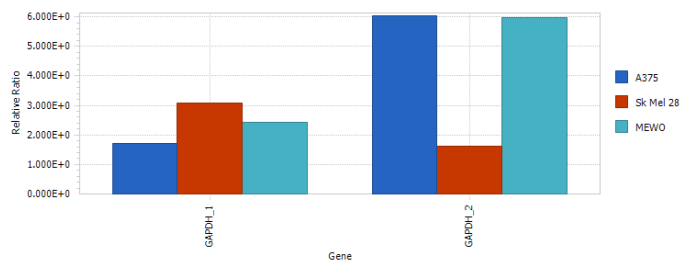


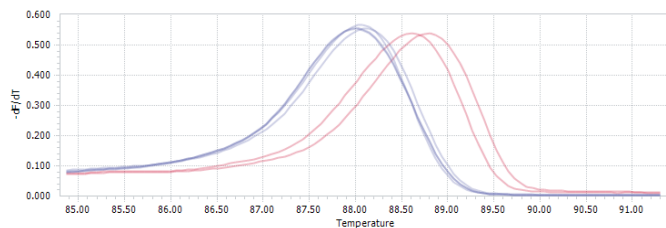
Abbildung 6: Schmelzkurven der GAPDH-Proben



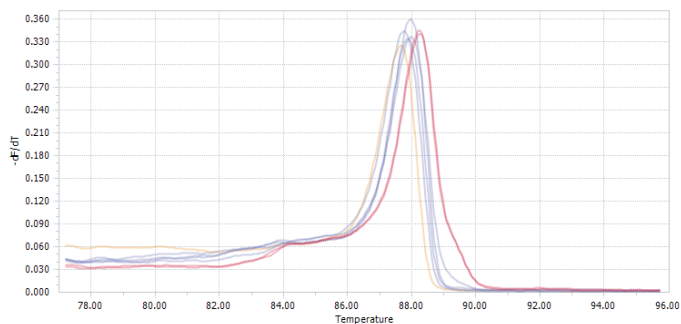
(a) Image 1



(b) Image 2



(c) Image 3



(d) Image 4

Abbildung 7: Four images arranged in a 2x2 grid.

qPCR-Ergebnisse

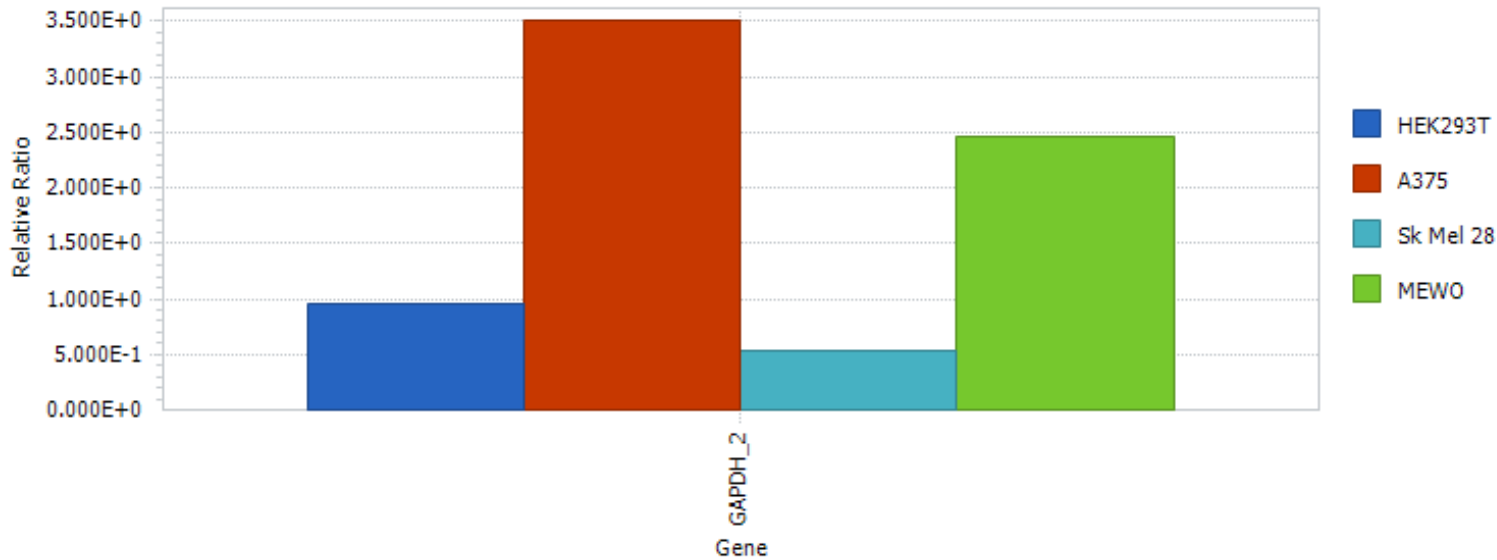


Abbildung 8: Verhältnisse der Amplifikationen der GAPDH-Proben

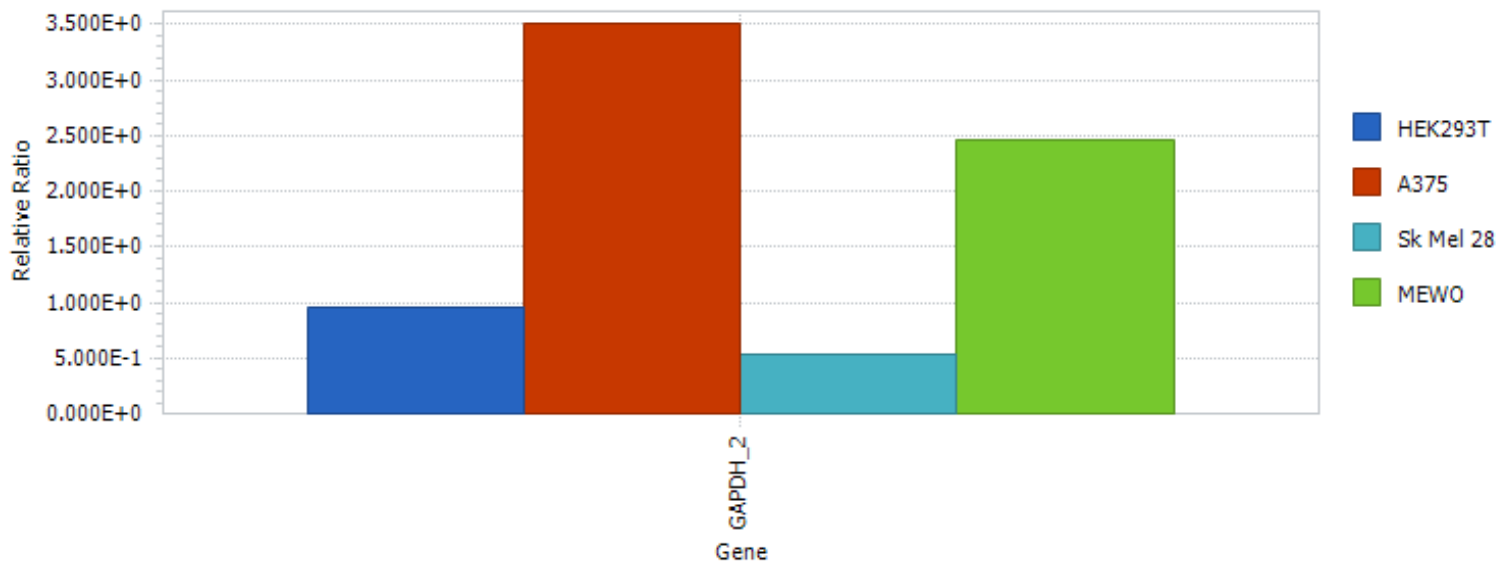


Abbildung 9: Verhältnisse der Amplifikationen der GAPDH-Proben zu Beta-Actin

Gene	Cell Line	Max Temperature
GAPDH_2	A375	88.2369276724924
GAPDH_2	A375	88.2369276724924
GAPDH_2	Sk Mel 28	87.9079894404074
GAPDH_2	HEK293T	87.9737770868244
GAPDH_2	MEWO	87.9737770868244
GAPDH_2	Sk Mel 28	87.7764141475733
GAPDH_2	HEK293T	87.6448388547393
GAPDH_1	HEK293T	84.0634157385831
GAPDH_1	MEWO	83.7362744888823
GAPDH_1	Sk Mel 28	84.1288439885233
GAPDH_1	HEK293T	84.1288439885233
GAPDH_1	MEWO	84.0634157385831
GAPDH_1	Sk Mel 28	83.8017027388225
GAPDH_1	HEK293T	84.0634157385831
GAPDH_1	Sk Mel 28	83.7362744888823
GAPDH_1	A375	84.3251287383437
GAPDH_1	A375	84.3905569882839
GAPDH_1	A375	84.3251287383437
b_actin	MEWO	88.0846082426742
b_actin	Sk Mel 28	88.0189293594156
b_actin	MEWO	88.0846082426742
b_actin	Sk Mel 28	88.0189293594156
b_actin	A375	88.8070759585186
b_actin	A375	88.6100393087428

Gene	Average	Standard Deviation
GAPDH_2	87.96437885162194	0.2196052057817102
GAPDH_1	84.06936376130494	0.23123966302554017
b_actin	88.27069841190684	0.34608887024272494

5 Diskussion

Die Quantifizierung der RNA erfolgte relativ im Verhältnis zu beta-Actin. Wobei davon ausgegangen wurde, dass die beta-Actin mRNA in allen Zelllinien in gleicher Menge vorhanden ist. Jede Probe wurde in zwei technischen Replikaten analysiert. Die Auswertung der Amplifikationskurven mithilfe der LightCycler96 Software ergab:

Literatur

[1] National Center for Biotechnology Information. Genes for homo sapiens (human) - ncbi. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Zelllinie	GAPDH (Primer 1) beta Actin	GAPDH (Primer 2) beta Actin	GAPDH (Primer 1) GAPDH (Primer 2)
A375	Row 1, Col 2	Row 1, Col 3	
MEWO	Row 2, Col 2	Row 2, Col 3	
SKM	Row 3, Col 2	Row 3, Col 3	
HEK293T	Row 3, Col 2	Row 3, Col 3	

Tabelle 8: Sample Table

`datasets/gene/id/2597/products/`. Accessed: 2024-06-24.

- [2] National Center for Biotechnology Information. Gene: Gapdh glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2597/#reference-sequences>, 2024. Accessed: 2024-06-25.
- [3] Thermo Fisher Scientific. Interpretation of nucleic acid 260/280 ratios. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>, 2024. Accessed: 2024-06-25.
- [4] Thermo Fisher Scientific. Quantitating rna. <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/quantitating-rna.html>, 2024. Accessed: 2024-06-25.