

RNA-Quantifizierung mittels qPCR

Thorsten Enge David Maruhn

15. Juni 2024

Inhaltsverzeichnis

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

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 einer RNA bedeutet nicht zwangsläufig, dass das Gen nicht auf dem Genom vorhanden ist, sondern dass es nicht transkribiert wird.

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-Bisphosphoglycerat 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

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

Lysat erstellen

Zunächst wurden 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 wurden die Zellen aufgebrochen und der Zellinhalt für die weitere Prozessierung zugänglich gemacht.

gDNA entfernen

Im nächsten Schritt wurde aus dem Lysat die genomische DNA (gDNA) durch Waschung über einer Removal Column entfernt. Hierfür wurden 800 µl Lysat in die gDNA Removal Column überführt und für 1 Minute bei 10.000 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert.

RNA isolieren und Nebenprodukte entfernen

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 bei 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.

DNase 1 Behandlung

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.

Elution der RNA

Es folgte eine Waschung mit 500 µl Priming 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. Die Elution der RNA erfolgte, 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 dient der Bewertung der Qualität der aufgereinigten RNA aus den Zellpellets. Hierfür wurde 1 µl der Probe vermessen. Ziel war es, das Verhältnis der Absorption bei den Wellenlängen 260/280 [nm] zu überprüfen. Der experimentelle Schwellwert für eine weiterverwendbare RNA-Konzentration in der Probe liegt bei ca. 20. Die Messung fand in einem Spektrophotometer DS-11+ von DeNovix statt. Benutzt wurde das RNA-Programm. Zunächst musste eine Blank-Messung durchgeführt werden, um dem Spektrophotometer einen Bezugsrahmen für folgende Messungen zu geben. Dies erfolgte durch die Messung von 1 µl nukleasefreiem H₂O. Nach der Eichung des Referenzrahmens folgte die Messung der einzelnen Proben, stets mit 1 µl Probe auf der Mikrovolumenabsorptionseinheit, die nach jeder Messung mit der gleichen Menge nukleasefreiem H₂O gereinigt wurde.

3.2 cDNA-Synthese aus isolierter RNA

Mischen der Komponenten

Für die RT-PCR wurde ein Reaktionsvolumen von 20 µl festgelegt. Die Komponenten wurden in ein 15 ml Eppendorf-Gefäß gefüllt und abzentrifugiert.

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

Inkubation

Die Inkubation erfolgte im Heizblock TS pro – CellMedia 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)

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 H_2O und 1 μl cDNA oder nukleasefreies H_2O für die NTC. Die Master Mixe wurden in PCR-Tubes transferiert. Die cDNA und das alternative H_2O 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 [$^{\circ}\text{C}$]	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

4 Diskussion

5 Schlussfolgerung