

Laborprotokoll: RNA-Isolation und Spektroskopie

Technische Hochschule Deggendorf (THD)
Fakultät Angewandte Informatik
Dr. Stefan Fischer

Einleitung

In dieser Laborübung wird die Isolation und Reinigung von RNA aus kultivierten humanen Zelllinien mittels des Monarch® Total RNA Miniprep Kits (NEB) durchgeführt. Anschließend wird die RNA-Konzentration mittels Spektroskopie bestimmt.

Materialien

- Monarch Total RNA Miniprep Kit
- Lyse Buffer (800 µl, aliquotiert)
- gDNA Removal Column mit Sammelröhrchen
- RNA Purification Column mit Sammelröhrchen
- RNA Wash Buffer (aliquotiert)
- DNase I (auf Eis, aliquotiert)
- DNase I Reaction Buffer (75 µl, aliquotiert)
- Priming Buffer (aliquotiert)
- Nukleasefreies H₂O
- Ethanol ($\geq 95\%$, 800 µl, aliquotiert)
- Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 ml, nukleasefrei)

- Tischzentrifuge (MicroStar 17R – VWR)
- Vortexer (Heathrow Scientific)
- Pipetten (1-10 µl, 20-100 µl, 200-1000 µl)
- Pipettenspitzen (1-10 µl, 20-100 µl, 200-1000 µl)
- Mini-Tischzentrifuge (Heathrow Scientific – Biozym)
- Rack und Box mit Eis

Vorbereitungen

- Tragen Sie immer Handschuhe.
- Reinigen Sie Werkbank, Racks, Pipetten und Spitzenboxen mit 70%igem Ethanol, um die Verunreinigung mit Nucleasen zu vermeiden.
- Bereiten Sie Puffer, Vials/Tubes, Enzyme (auf Eis) und nukleasefreies H₂O vor.
- Kühlen Sie die Tischzentrifuge auf 4 °C.

Durchführung

Teil 1: RNA-Isolation aus kultivierten humanen Zelllinien

Die RNA wird aus kultivierten humanen Zelllinien isoliert. Das Ausgangsmaterial ist ein Zellpellet, am Ende des Schrittes haben wir eine RNA-Probe in nukleasefreiem H₂O, die für weitere Analysen verwendet werden kann.

Probenaufschluss und Homogenisierung

1. Zellpellet auf Eis auftauen.
2. Zellen bei 4°C für 2 Minuten und 10.000 rpm abzentrifugieren.
3. Überstand vorsichtig abnehmen, ohne das Pellet zu beschädigen.
4. Pellet in 800 µl Lysepuffer resuspendieren und sanft pipettieren, um Aufschäumen zu vermeiden. Probe bei Raumtemperatur weiterbearbeiten. Durch den Lysepuffer wird die RNA stabilisiert und die Zellmembranen werden lysiert und die Proteine denaturiert.

RNA-Bindung und Elution

1. 800 µl Lysat in die gDNA Removal Column (hellblau) überführen und abzentrifugieren (1 min, 10.000 rpm, RT). Das gDNA Removal Column besteht aus einer speziellen Matrix, die DNA bindet und RNA durchlässt.
2. gDNA Removal Column entsorgen und den Durchsatz in eine neue RNA Purification Column (dunkelblau) überführen. Die RNA Purification Column enthält eine spezielle Matrix aus Silika, die RNA bindet.
3. Gleiche Volumen Ethanol ($\geq 95\%$) zum Durchsatz hinzufügen und mischen. Durch das Ethanol wird die Matrix aktiviert und die RNA bindet besser an die Matrix. Ausserdem wird die Konzentration der RNA pro Volumen reduziert, was die Bindung an die Matrix verbessert.
4. Zentrifugieren (1 min, 10.000 rpm, RT). Im Durchsatz verbleiben die Proteine und andere Verunreinigungen, während die RNA an die Matrix bindet. Der Durchsatz wird verworfen.
5. 500 µl RNA Wash Buffer auf die Säule geben und 1 min zentrifugieren. Der RNA Wash Buffer entfernt Verunreinigungen und Salze von der Matrix, ohne die RNA zu beeinträchtigen, der Durchsatz wird verworfen.
6. 5 µl DNase I in 75 µl DNase I Reaction Buffer pipettieren, kurz vortexen und auf die Säulenmatrix pipettieren. 15 min bei RT inkubieren. Die DNase I entfernt DNA-Verunreinigungen von der Matrix. Der Reaktionspuffer stabilisiert die DNase I und erhöht die Effizienz der DNase I.
7. Säule mit RNA Wash Buffer (2x 500 µl) waschen und jeweils 1 min zentrifugieren. Durchsatz verwerfen. Der RNA Wash Buffer entfernt die Restlichen Verunreinigungen und Salze von der Matrix, ohne die RNA zu beeinträchtigen.
8. Elution: Säule in ein nukleasefreies 1,5 ml Röhrchen überführen und 50 µl nukleasefreies H₂O auf die Säule pipettieren. 1 min zentrifugieren. Die RNA wird von der Matrix in das nukleasefreie H₂O eluiert.
9. Die in H₂O eluierte RNA auf Eis lagern oder bei -20°C (kurzfristig) bzw. -80°C (langfristig) aufbewahren.

Teil 2: Spektroskopie - Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Material

- Nukleasefreies H₂O
- Tischzentrifuge MicroStar 17R – VWR
- Spektrophotometer DS-11+ - DeNovix
- Pipetten 1-10 µl
- Pipettenspitzen 1-10 µl
- Präzisionswischtücher Kimtech Science

Durchführung

Für die spektrophotometrische Analyse der isolierten Nukleinsäuren kann es erforderlich sein, die eluierte Probe erneut zu zentrifugieren und ein Aliquot aus der oberen Schicht der Flüssigkeit zu entnehmen. Dabei wird sichergestellt, dass die Messung bei A_{260/230} nicht durch eine Kontamination von z.B. Silica-Partikeln beeinträchtigt wird.

1. Spektrophotometer einschalten und warten, bis die Startphase beendet ist.
 - WICHTIG: Deckel nicht öffnen!
2. RNA-Programm auswählen.
3. Für die Messung die Microvolumenabsorption verwenden.
 - WICHTIG: Die Oberfläche der Mikrovolumens-Absorptionseinheit nicht mit der Pipettenspitze berühren.
 - Leerwert (Blank) mit 1 µl Elutionsmittel (nuklease-freies H₂O) messen. Den Deckel langsam schließen. Reinigung der Oberfläche mit einem Spezialtuch. Die Blank-Messung wird für die Korrektur der Probe benötigt. Da das Elutionsmittel spezifische Absorptionswerte hat, wird es als Referenzwert verwendet, welche von der Probe abgezogen werden, dadurch wird die Absorption der Probe korrigiert.

- 1 µl der Probe messen. Deckel langsam schließen, die Oberfläche nach der Messung reinigen.
 - Bei Bedarf die Lösung 2x messen.
4. Konzentration wird unter >RUN< und in den >Reports< angezeigt. Konzentration und den OD-Wert der Probe notieren.
 5. Überprüfung der Grafik >GRAPH< und der Verhältnisse von 260/230 nm und 260/280 nm.

Part 1: Reverse Transkription – cDNA Synthese aus der isolierten RNA

Material

- M-MuLV Reverse Transcriptase New England Biolabs (NEB)
 - Enzyme (Konz.: 200.000 units/ml)
 - Reaction Buffer (Konz.: 10X)
- Random Primer Mix New England Biolabs (NEB) (Konz.: 60 µM)
- RNase Inhibitor, Murine New England Biolabs (NEB) (Konz.: 40.000 units/ml)
- dNTPs (Konz.: 10 mM)
- Nuclease-free H₂O
- Heizblock TS pro – CellMedia
- Mikrozentrifugenröhrchen (Eppi/Tube) 1.5 ml
- Pipetten 0.5 -10 µl, 10 – 100 µl
- Pipettenspitzen 0.5 -10 µl, 20 – 100 µl
- Mini-Tischzentrifuge Heathrow Scientific – Biozym
- Rack
- Box mit Eis

Zusätzliche Information des Herstellers

Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Dieses Enzym kann ausgehend von einem Primer einen komplementären DNA-Strang synthetisieren, wobei entweder RNA (cDNA Synthese) oder einzelsträngige DNA als Vorlage verwendet wird. Der M-MuLV- Reverse-Transkriptase fehlt die 3' → 5' – Exonuklease-Aktivität. Das Gen, das für die M-MuLV Reverse Transkriptase kodiert, wird in E. coli in einem Vektor exprimiert, der 16 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus und 13 Aminosäuren am C-Terminus enthält. Dieses Konstrukt führt zu einem voll funktionsfähigen Reverse-Transkriptase-Protein mit einer funktionsfähigen RNase-H-Domäne.

Vorbereitungen

1. Heizblock auf 25 °C stellen, mit einer Zeit von 5 min, nicht schütteln.
2. Puffer, dNTPs, Random Primer Mix und RNA auf Eis auftauen (Komponenten siehe Tabelle 1). RNase Inhibitor und die M-MuLV Reverse Transkriptase bis zur Benutzung weiterhin auf -20 °C lagern.

Durchführung

1. Die Tabelle 1 zeigt die Bestandteile sowie die Volumina der einzelnen Komponenten für die RT-PCR (cDNA Synthese).

Komponenten	Volumen
Nukleasefreies H ₂ O	to a total Volume of 20 µl = _____
Random Primer Mix (60 µM)	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
0,5 µg RNA	X µl = _____ µl

Table 1: Komponenten und Zusammensetzung der RT-PCR

2. Berechnen Sie das notwendige Volumen der RNA (0,5 µg RNA/Tube) und des nukleasefreien H₂O.

- Beispiel: Gemessene RNA-Konzentration: 260 ng/μl

$$\frac{500 \text{ ng}}{260 \text{ ng}/\mu\text{l}} = \frac{x \text{ }\mu\text{l}}{1 \text{ }\mu\text{l}}$$

$$x \text{ }\mu\text{l} = \frac{500 \text{ ng} \times 1 \text{ }\mu\text{l}}{260 \text{ ng}/\mu\text{l}} = 1,9 \text{ }\mu\text{l RNA pro Reaktion}$$

3. 1 Eppi beschriften und auf Eis stellen.
4. Alle Komponenten (Reihenfolge siehe Tabelle 1) in das vorbereitete Eppi pipettieren.
5. Eppis verschließen. Kurz mittels Mini-Tischzentrifuge abzentrifugieren, wenn Blasen im Tube vorhanden sind.
6. Im Heizblock folgende Inkubationsschritte durchführen:
 - 5 min bei 25 °C
 - 60 min bei 42 °C
 - 20 min bei 65 °C