

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	Ergebnisse	5
5	Diskussion	5
6	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 Mini-prep Kit (NEB)

1. Lysat erstellen
2. gDNA entfernen
3. RNA isolieren und Nebenprodukte entfernen, unter Nutzung von Ethanolpräzipitation, um die Haftung der RNA zu erleichtern.
4. DNase 1 zerstört Reste der DNA
5. 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 genomische 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 1µl 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 musste eine blank-messung durchgeführt werden, 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 der gleichen Menge 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

4 Ergebnisse

5 Diskussion

6 Schlussfolgerung