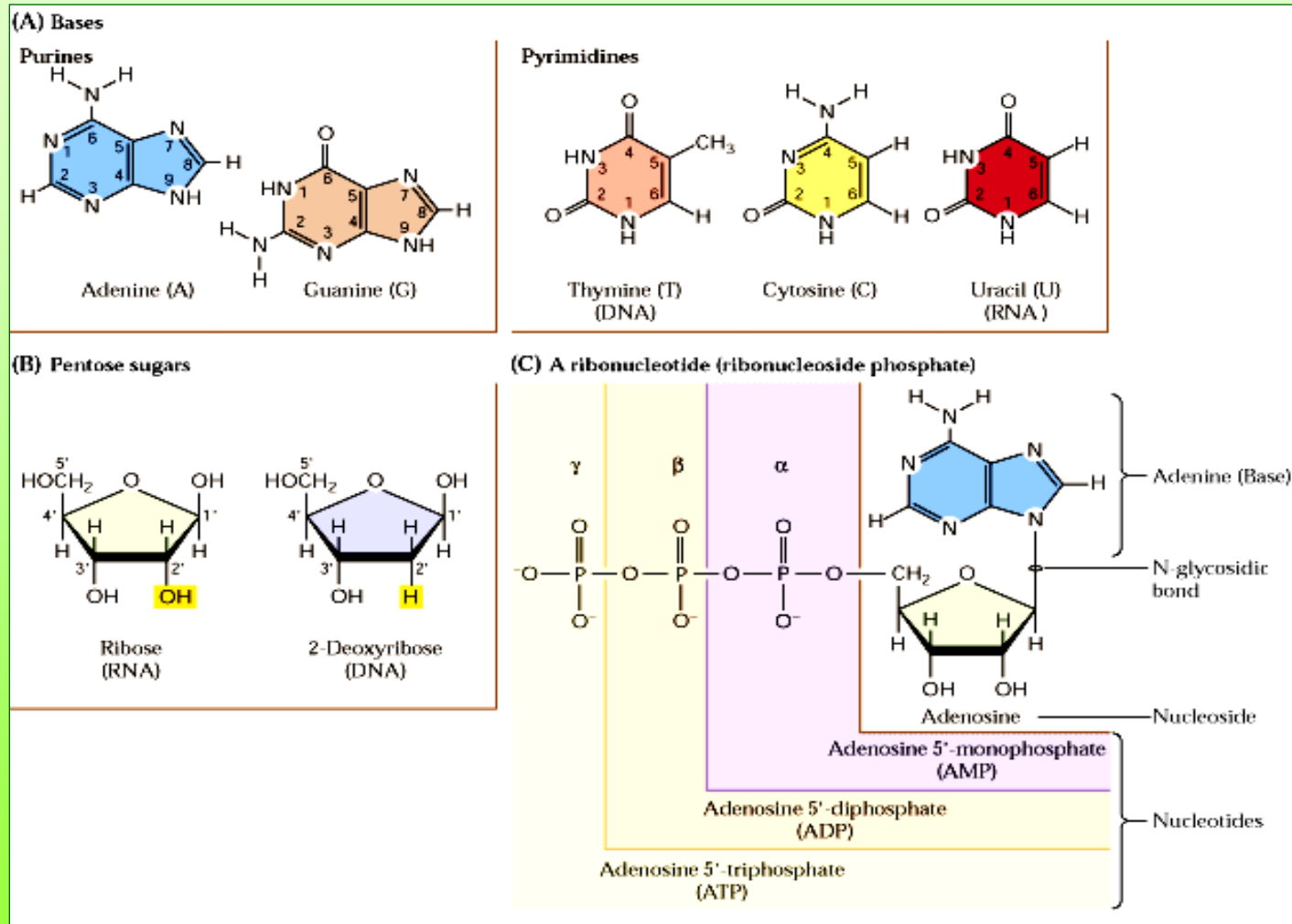


# Arbeiten mit RNA



# Unterschiede zwischen DNA und RNA

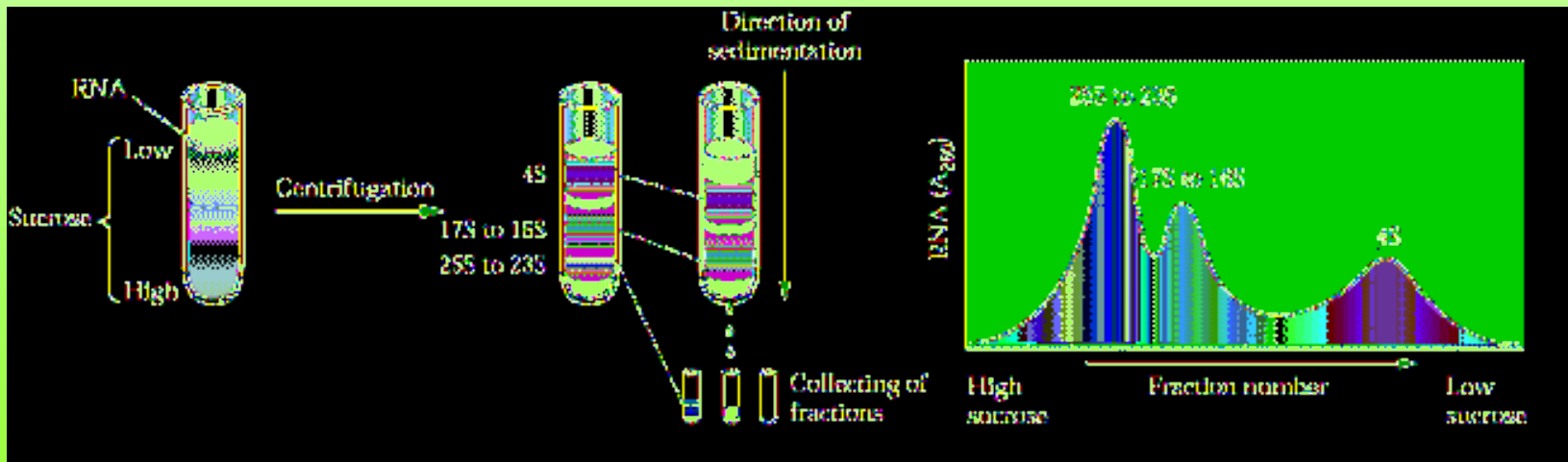
## RNA ist einzelsträngig – fragil!!!

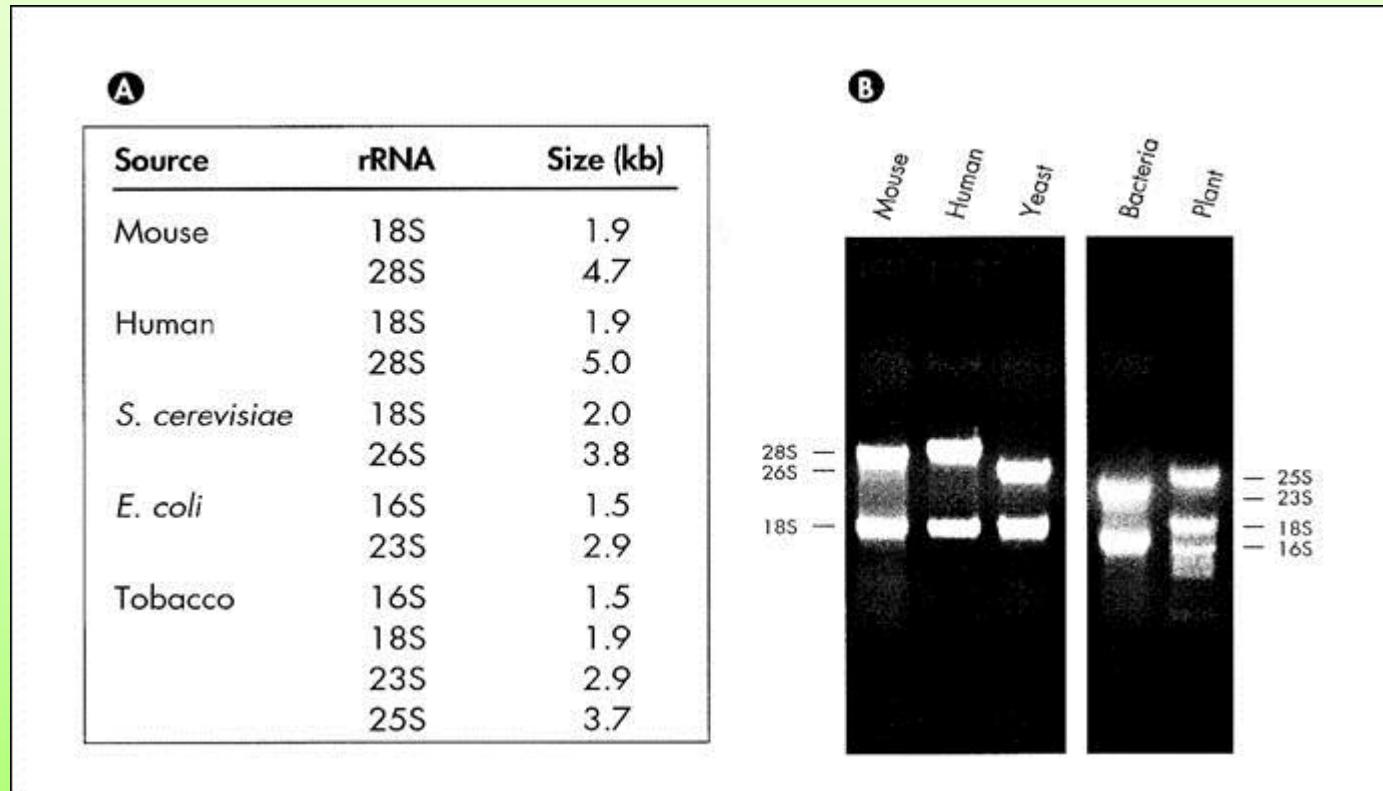


# Einteilung der RNA

<b>mRNA</b>	Messenger (Boten)-RNA	Transkription
<b>sRNA</b>	smallRNAs	Regulation
<b>tRNA</b>	Transport RNA	Translation
<b>rRNA</b>	Ribosomale RNA	Translation

Ribosomale RNAs werden nach ihrer Größe eingeteilt





80S-Ribosomen bestehen aus 60S und 40S-Untereinheit:

**60S-Untereinheit: 25S-rRNA + 5,8S-rRNA + 5S-rRNA**

**40S-Untereinheit: 18S-rRNA**

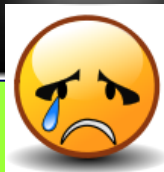
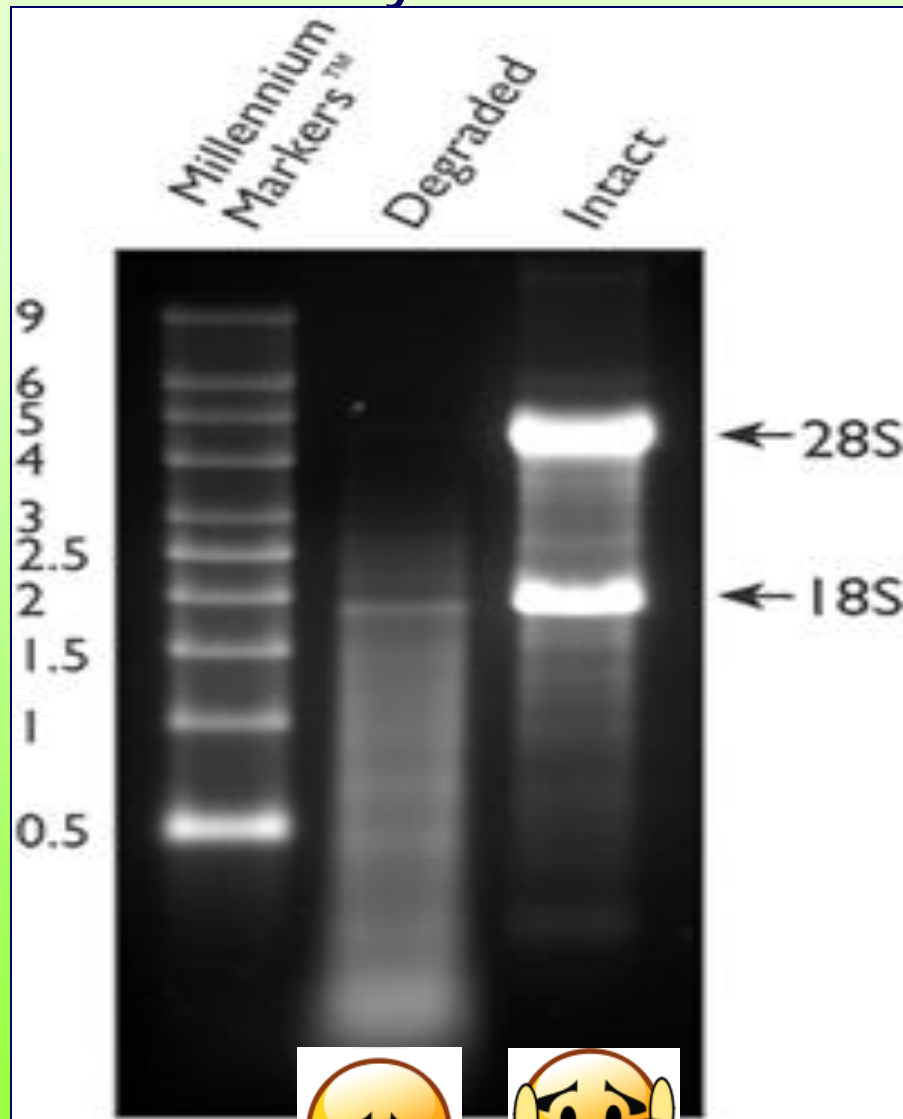
70S-Ribosomen befinden sich im Stroma bzw. der Matrix von Chloroplasten und Mitochondrien

**50S-Untereinheit: 23S-rRNA + 5S-rRNA + 4,5S-rRNA** Pflanzenphysiologie

**30S-Untereinheit: 16S-rRNA**



# Isolation von eukaryotischer Gesamt-RNA



# Isolation von pflanzlicher RNA

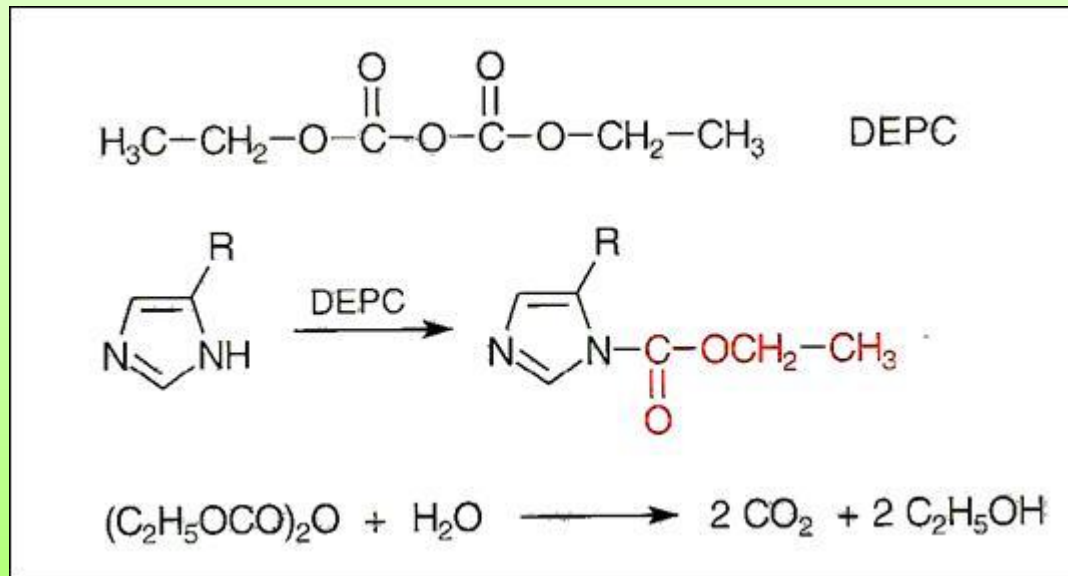
Die Isolation von RNA wird durch **RNasen** erschwert!

→ Vorsichtsmaßnahmen:

1. Geerntetes Pflanzenmaterial sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrieren!
2. Handschuhe tragen!
3. Sterile Plastikgefäße verwenden!
4. Pipettenspitzen mit Filter verwenden!
5. Glaswaren durch Hitzebehandlung dekontaminieren!
6. Lösungen mit RNase-Inhibitoren behandeln!



# Wirkung von DEPC (Diethylpyrocarbonat)



- Inaktiviert RNAsen und andere Enzyme durch kovalente Modifikation der primären und sekundären Amine (z. B. Histidine)
- Nach Hitzebehandlung zerfällt DEPC in  $\text{CO}_2$  und EtOH



# Chemikalien

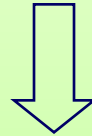
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Behandlung von Pufferlösungen und Glasgefäße, kovalente Modifikation von Proteinen, muss durch Autoklavieren inaktiviert werden  Problem: nicht mit allen Puffern kompatibel, karzinogen
RNase AWAY RNAsecure reagent	Zusammensetzung und Wirkungsweise unbekannt, mit allen Puffern kompatibel, nicht karzinogen
SDS, Natriumdesoxycholat	Denaturierende Wirkung
$\beta$ -Mercaptoethanol	Reduzierende Wirkung
Guanidium -HCL Guanidiumthiocyanat	In Verbindung mit dem Zellausschluss, denaturiert RNasen irreversibel
Formaldehyd	In denaturierenden Agarosegelen, führt zu kovalenten Modifikationen
Phenol (sauer, frisch)	Denaturierung der Proteinen, zur Deproteinierung von Zellextrakten



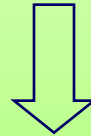


# Allgemeines Prinzip der RNA-Isolation

1. Lyse der Zellen



2. Inaktivierung der RNasen und Proteine



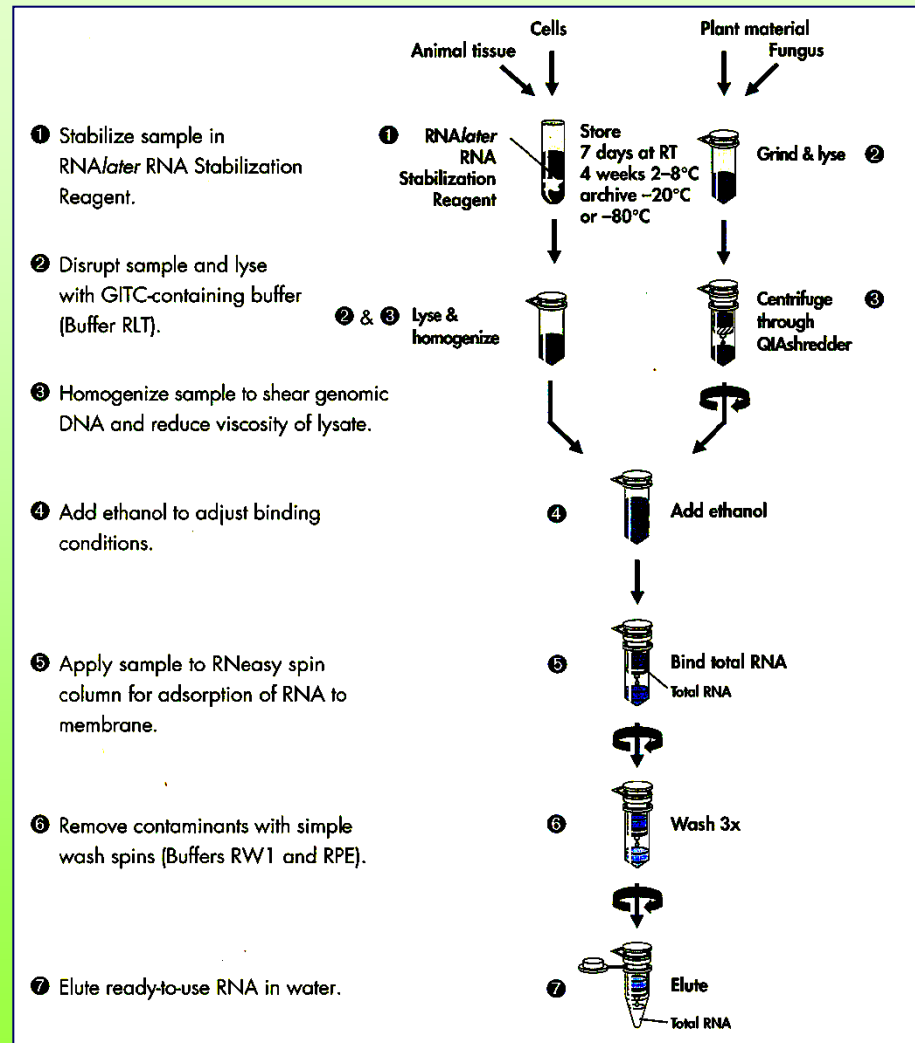
3. Isolation der Gesamt-RNA



4. Nachreinigen der RNA, **DNase** Verdau



# Isolation von RNA mittels Bindung an Silica-Matrix

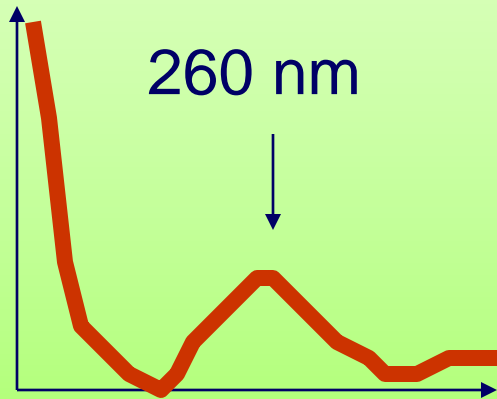


Kleine RNAs (<200 nt) werden meist nicht gebunden!



# Konzentrationsbestimmung der RNA

## Aufnahme eines UV-Spektrums



$$A_{260} = 1,0 = 40 \mu\text{g RNA/ml}$$

**Berechnung (Photometer – abhängig):**

$$\text{Verdünnung} \times 40 \times A_{260} = \mu\text{g RNA/ml}$$

**Reinheit:**

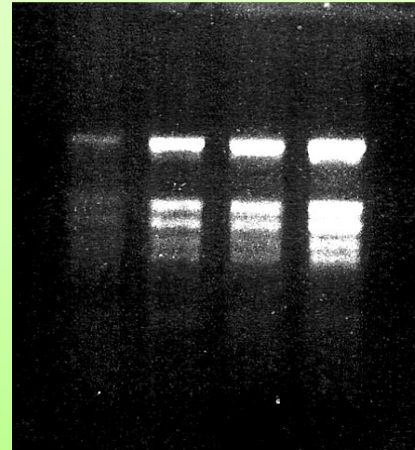
$$\text{Verhältnis } A_{260}/A_{280}$$

→ RNA rein: 1,9-2,1

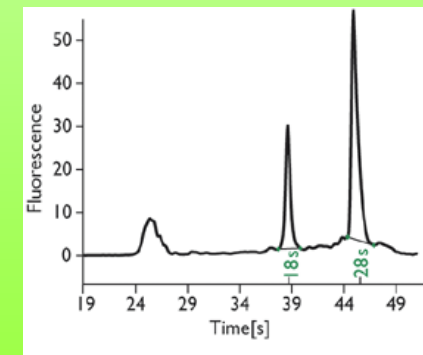


# Immer Qualität der isolierten RNA prüfen!

1. Denaturierendes Agarosegel mit Formaldehyd



2. Bioanalyzer (Agilent Technologies)



# Einsatz von RNA in molekularbiologischen Techniken

1. cDNA-(copyDNA)-Genbibliotheken

2. Expressionsanalysen



# Herstellung einer cDNA-Genbibliothek

1. Isolierung von Gesamt-RNA



2. mRNA-Isolierung



3. cDNA-Synthese



4. Vorbereitung der cDNA



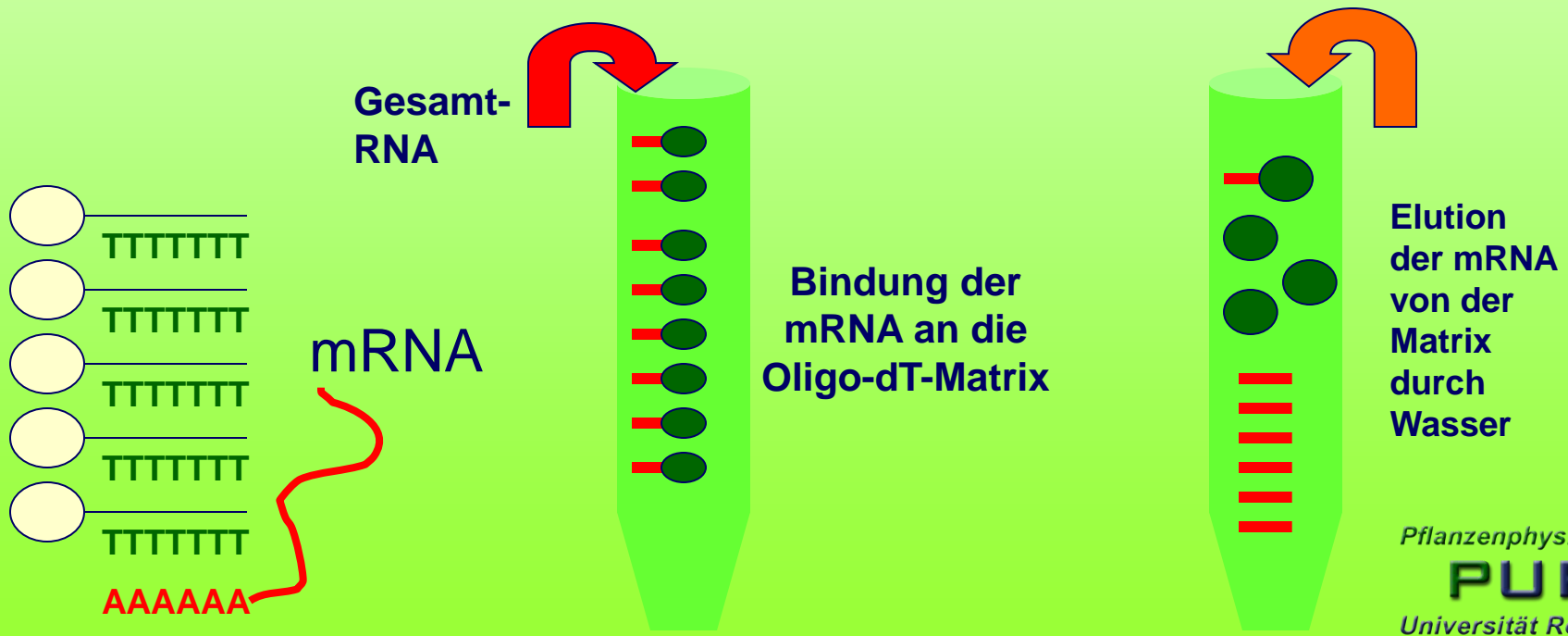
5. Einbau in Vektor



# mRNA-(PolyA)-Isolierung bei Eukaryoten

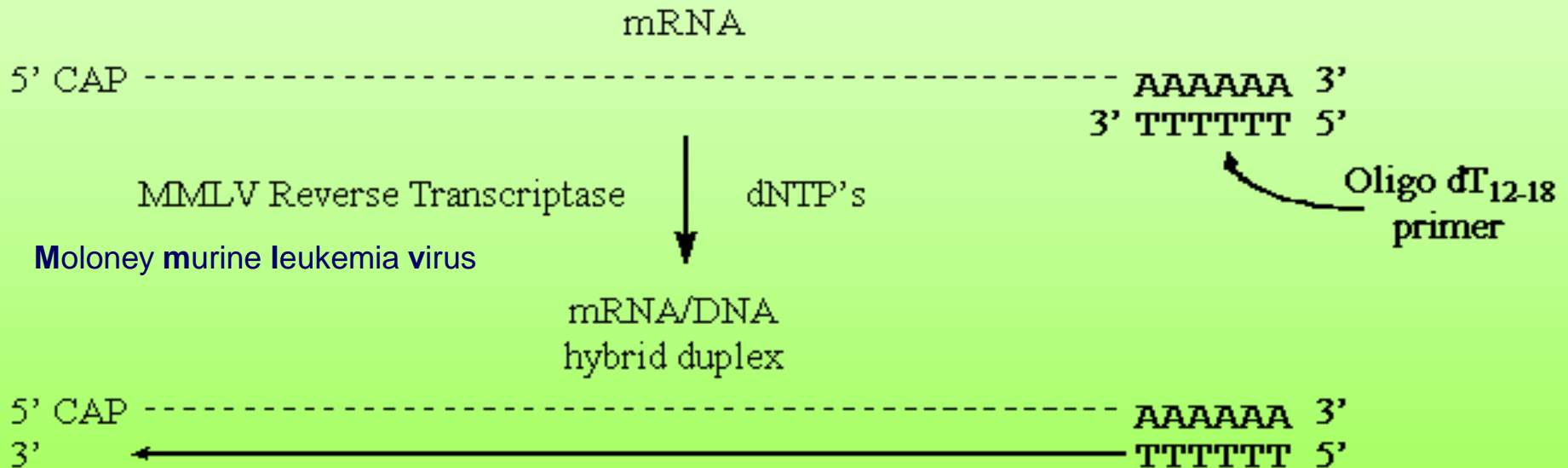


→ Kopplung einer Säulenmatrix mit Oligo-dT-Primern



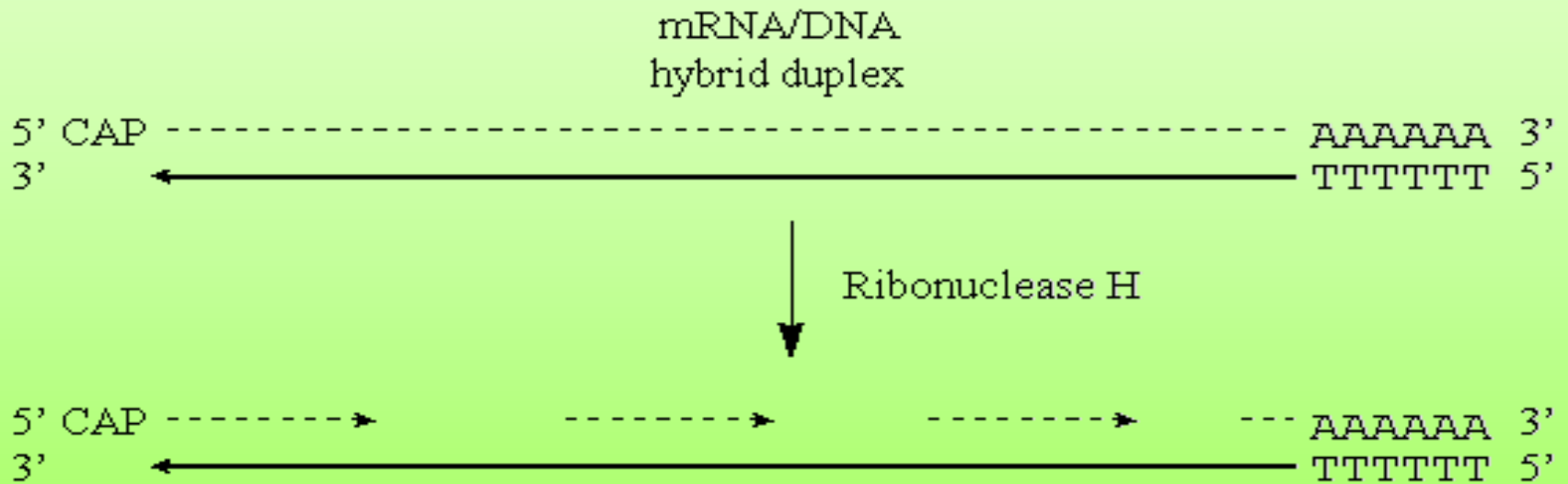
# Erststrang-Synthese, reverse Transcriptase

## cDNA Library Construction: First Strand Synthesis

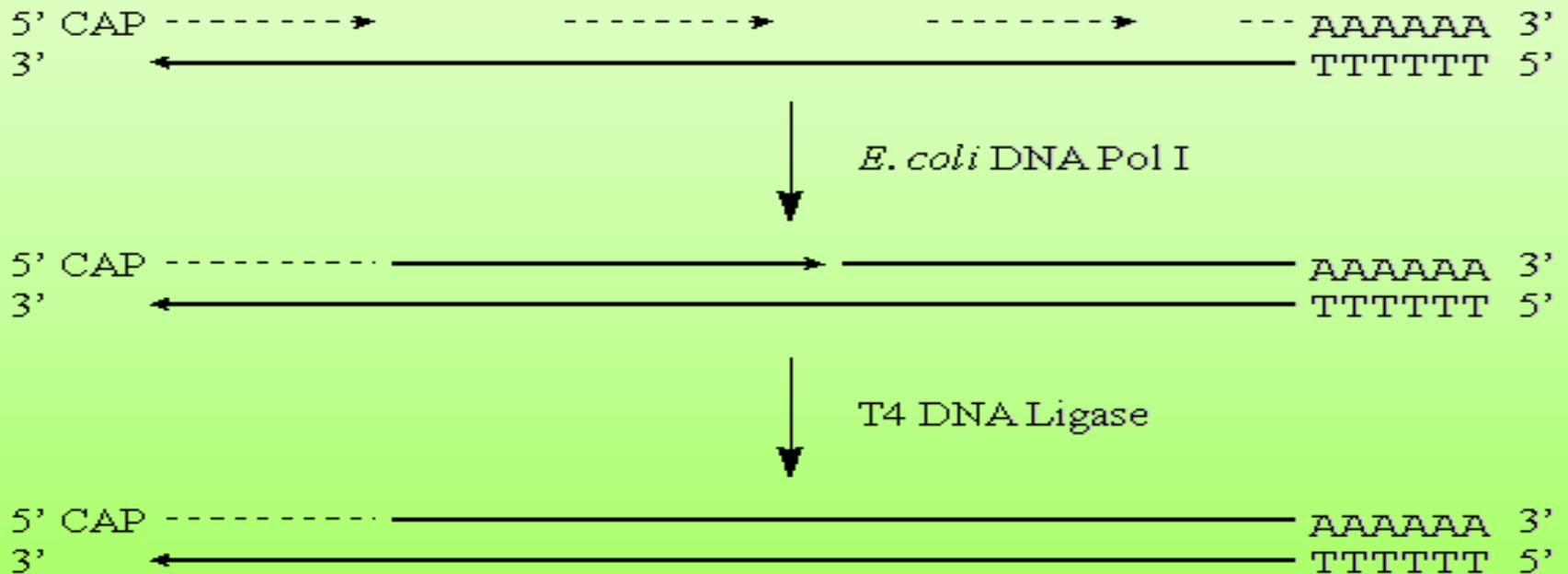




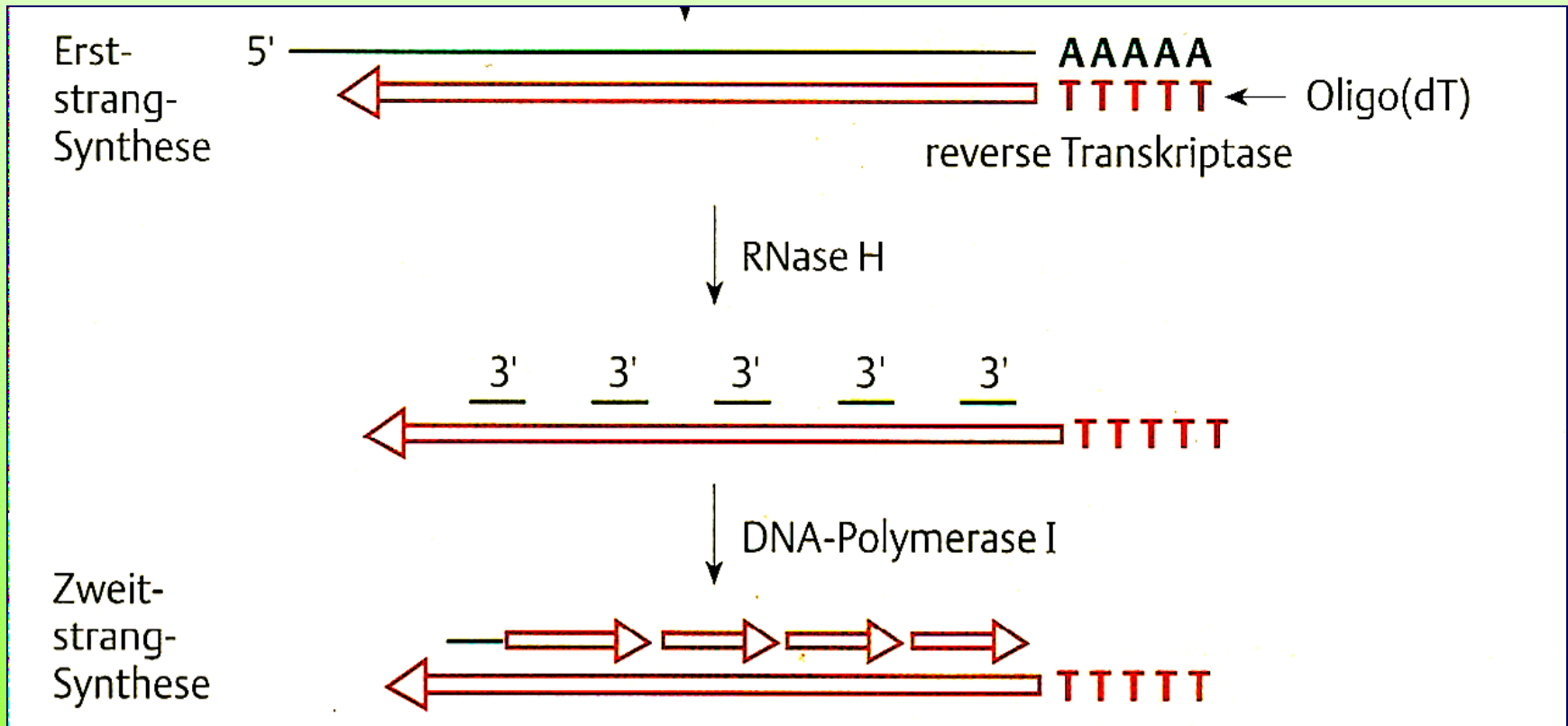
# Zweitstrang-Synthese



# Zweitstrang-Synthese



# Ursachen für Schwierigkeiten der Synthese des 5'-Endes einer cDNA



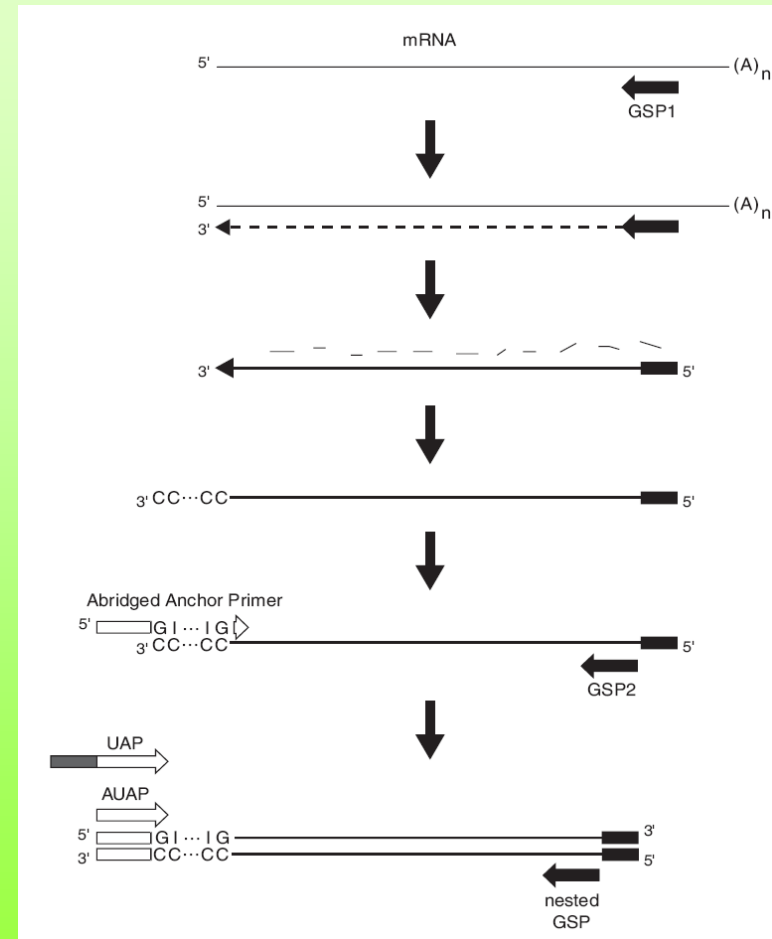
Primerproblem und RNA-Sekundärstrukturen!



# Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

## → 5'-RACE

1. Erststrang-Synthese mit genspezifischem antisense Primer
2. RNase-Behandlung
3. Anhängen eines Adapters
4. PCR mit Anchor-Primer und genspezifischem Primer



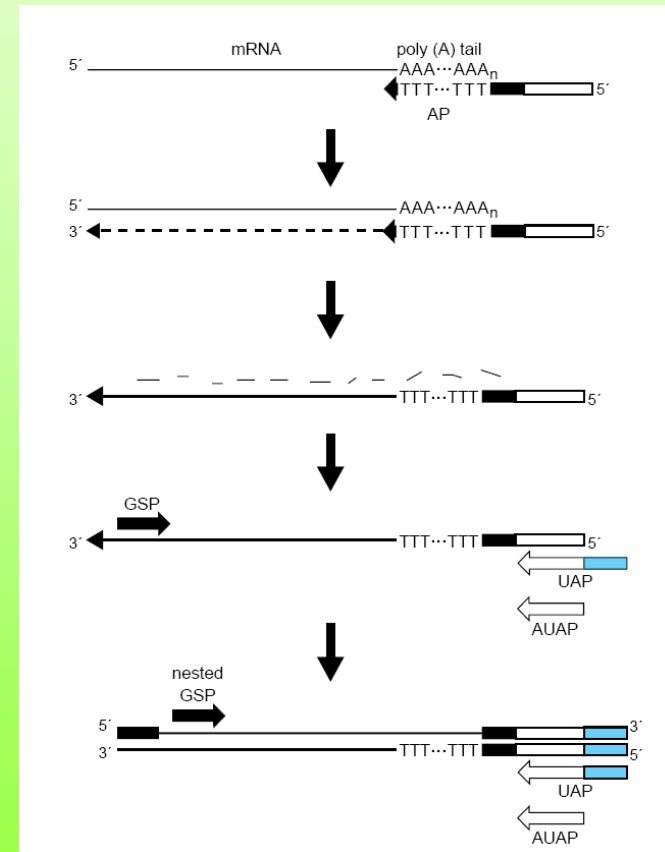
**Extrem wichtig für Promotoranalysen und Genmodelle!**



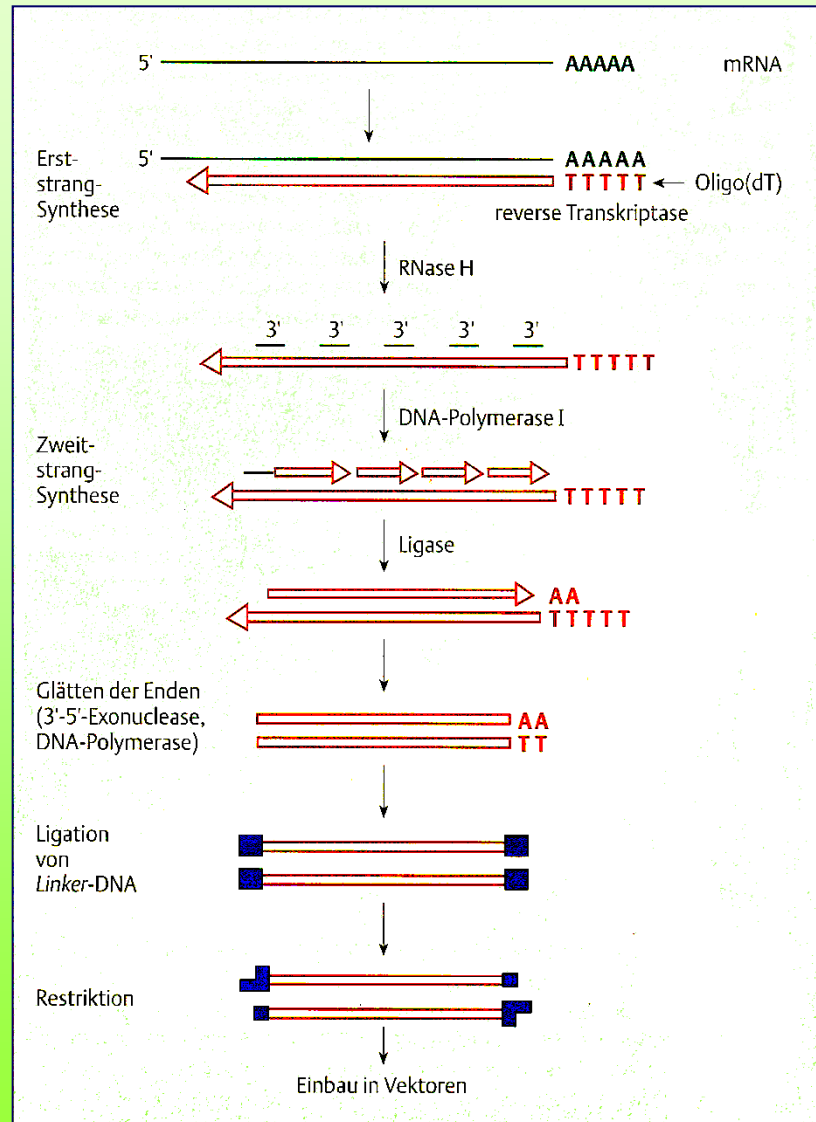
# Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

## → 3'-RACE

1. Erststrang-Synthese mit Oligo-dT-Primer
2. RNase-Behandlung
3. PCR mit genspezifischem und Oligo-dT-Primer



# Zusammenfassung cDNA-Genbibliothek



# Vor- und Nachteile von cDNA-Bibliotheken

## Vorteil

- Nur codierende Sequenzen enthalten
- Gewebe-, Zeitspezifität
- kann direkt in Bakterien exprimiert werden

## Nachteil

- Nie vollständig!  
→ Seltene RNAs fehlen
- cDNAs meist unvollständig
- aufwändig

### **ESTs: Expressed Sequence Tags**

- Sequenzierte cDNA-Stücken
- Genbanken („shot gun“)
- UNVOLLSTÄNDIG! aber viele!
- Keine DNA sondern Sequenzsammlung
- Gensynthese bei Bedarf



# Methoden der Expressionsanalyse von Einzelgenen

1. Northern Blot Analyse

2. RT-PCR versus real-time oder qPCR

3. Ribonuclease Protection Assay

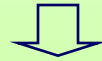




# Northern Blot

→ Nachweis von spezifischen durch Elektrophorese getrennten RNAs mittels Hybridisierung mit einer markierten DNA Sonde

1. Isolation von intakter RNA



2. Denaturierung der RNA



3. Auftrennung der RNA im denaturierenden Formaldehyd - Agarosegel



4. Transfer der aufgetrennten RNA auf eine Nylonmembran (Blotting)



5. Markierung einer genspezifischen DNA-Sonde



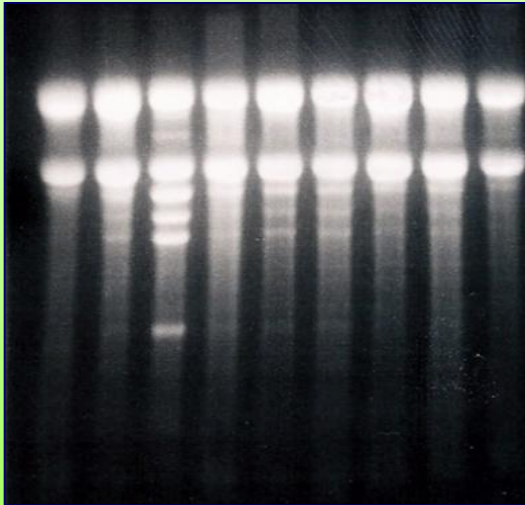
6. Hybridisierung



5. Transkriptnachweis durch Autoradiographie oder immunologische Methoden



# Isolation von intakter RNA und Auftrennung im Agarosegel (denaturierend, Formaldehyd)

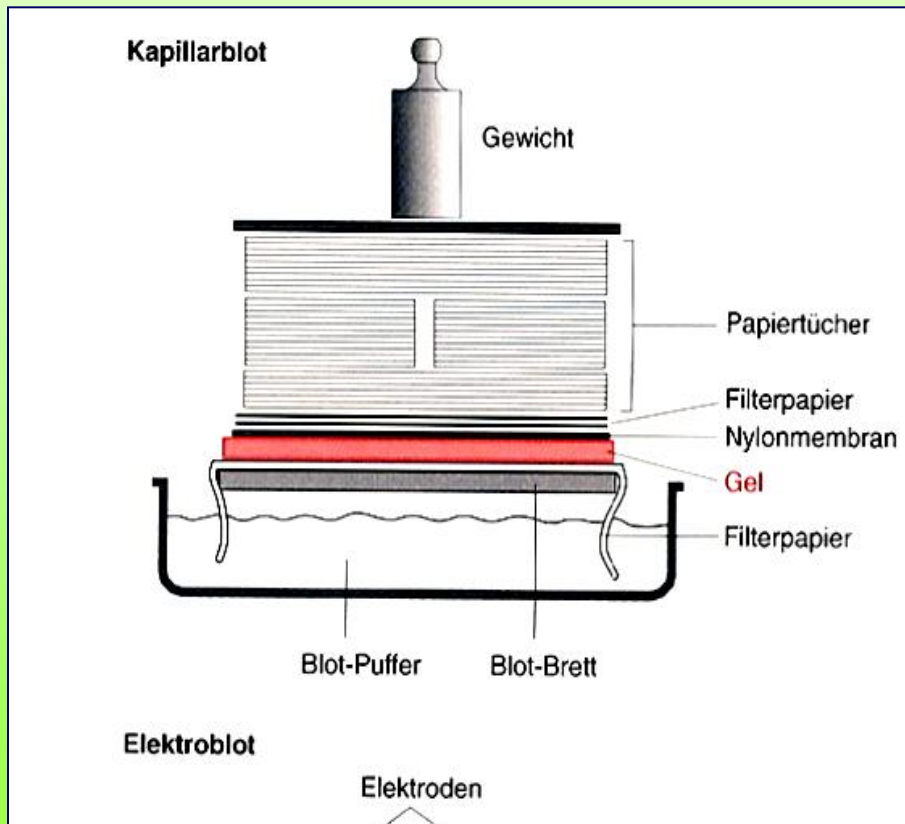


→Formaldehyd: reagiert mit Aminogruppen der Purin- und Pyrimidin-Basen unter Bildung einer Schiff'schen Base, verhindert damit die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen

→Formamid: Doppelhelix destabilisierendes Agens, verhindert die Reassoziaton von RNA-Molekülen



# Transfer der getrennten RNA auf Nylonmembranen durch Kapillarblotting



Bindung der RNA an die Nylonmembran

→ Backen: 2 h 75-80°C

→ Cross linking: UV-Strahlen



Hybridisierung der Membran mit der markierten Gensonde



# Markierungsmethoden von „Sonden“

1. 5'-Endmarkierung mit T4-Polynukleotid Kinase
2. 3'-Endmarkierung mit Terminaler Transferase
3. Nick-Translation
4. PCR-Labeling
5. Random Priming



+Fe -Fe

**Northern-Blot-Hybridisierung**

*Pflanzenphysiologie*

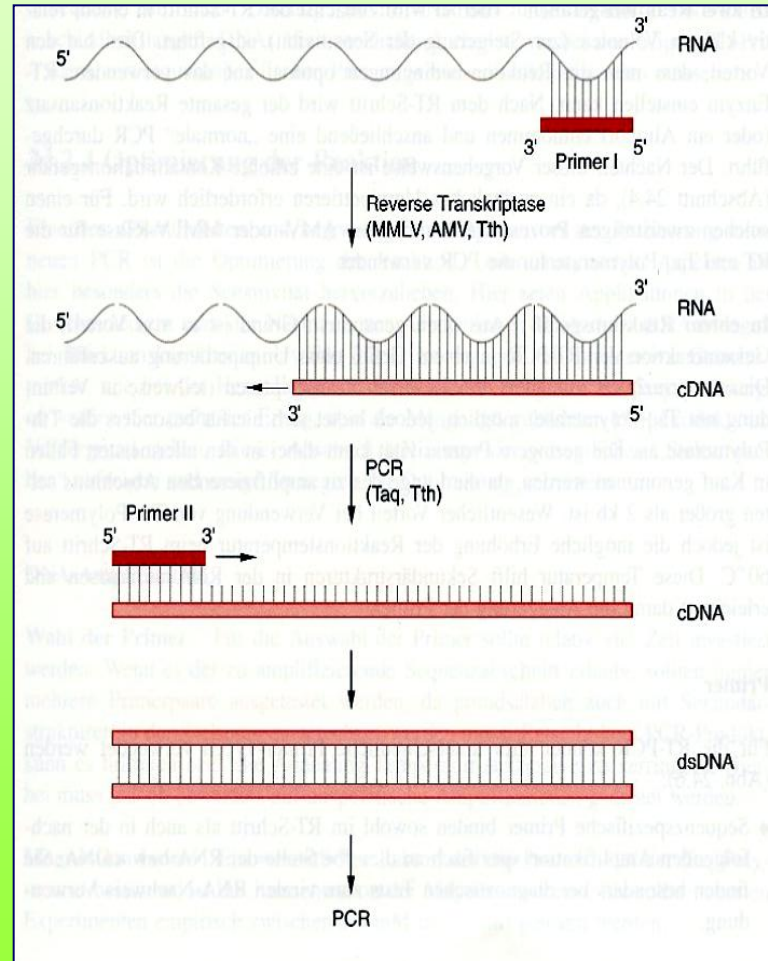
**PUR**

*Universität Rostock*



# RT-PCR

→ Kombination von reverser Transkription und Polymerase Ketten Reaktion (PCR)



# RT-PCR

## Vorteile:

- Sehr sensitiv durch Einsatz der PCR-Technik
- Sehr spezifisch, Unterscheidung von sehr ähnlichen Genen einer Gen-Familie möglich

## Problem:

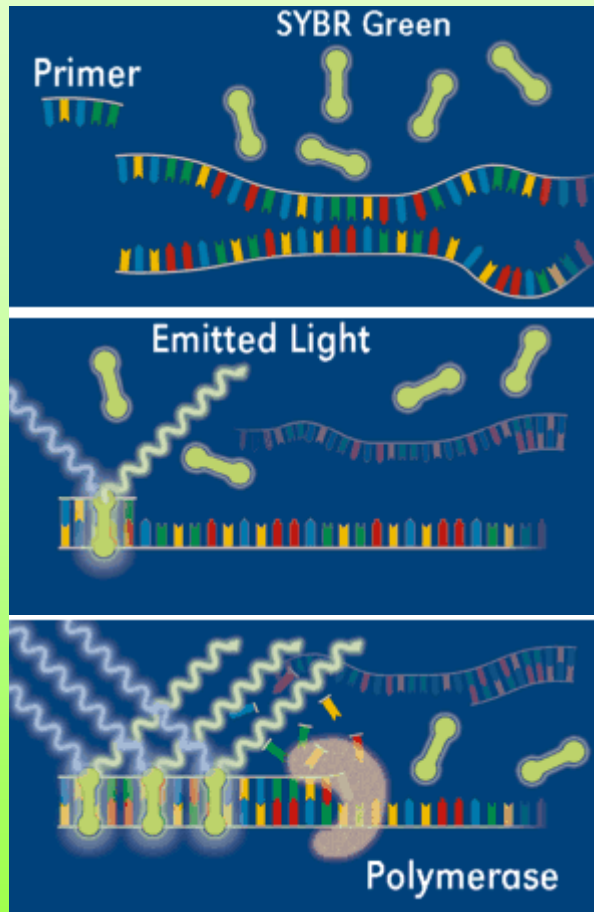
- Nicht wirklich quantitativ! Nur qualitative Aussagen möglich!!

## Voraussetzung:

- Hochreine RNA, keine Kontamination mit genomischer DNA
- Mitführen einer konstitutiven Genkontrolle



# Real time-PCR (qPCR)



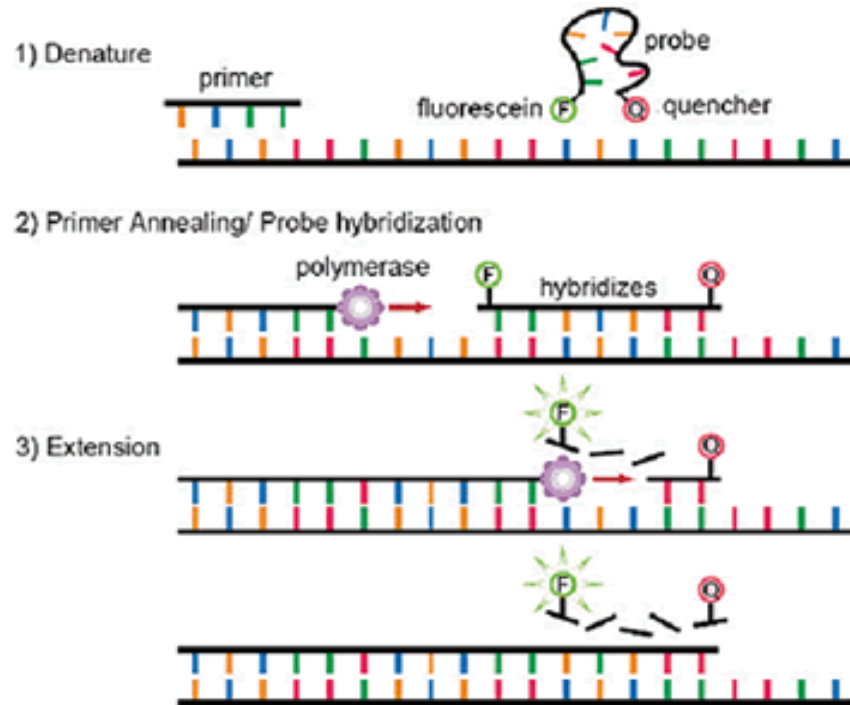
- Methode zur genauen Quantifizierung von mRNAs

- Beruht auf Einbau eines Farbstoffs, der bei Interkalation in DNA-Doppelstränge fluoresziert

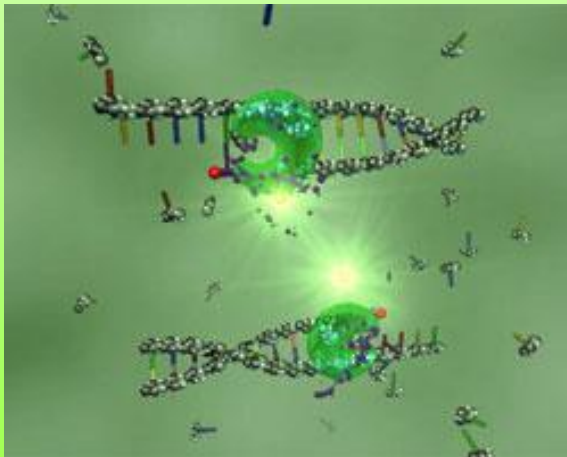
„SYBR-Green“



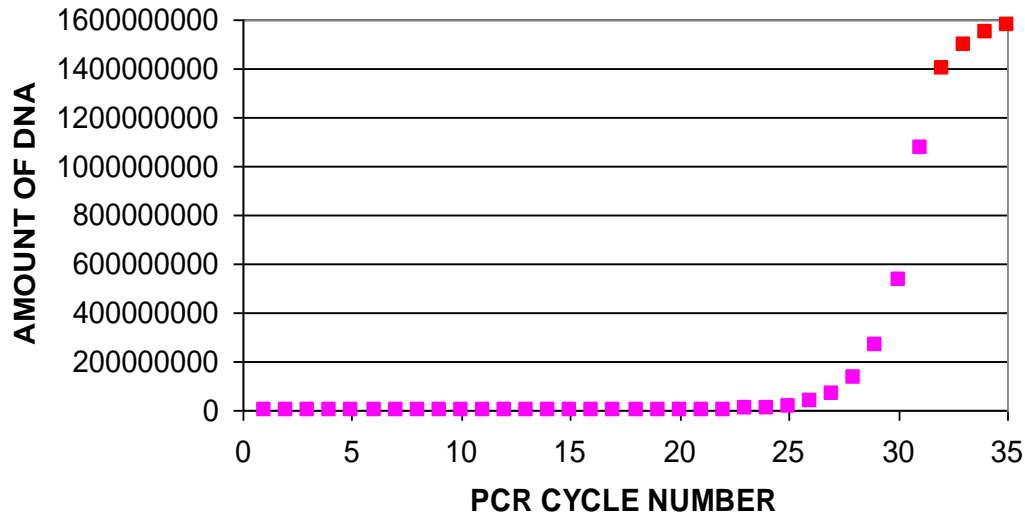
# Real time - PCR (TaqMan<sup>R</sup>)



TaqMan<sup>®</sup> Probe Method

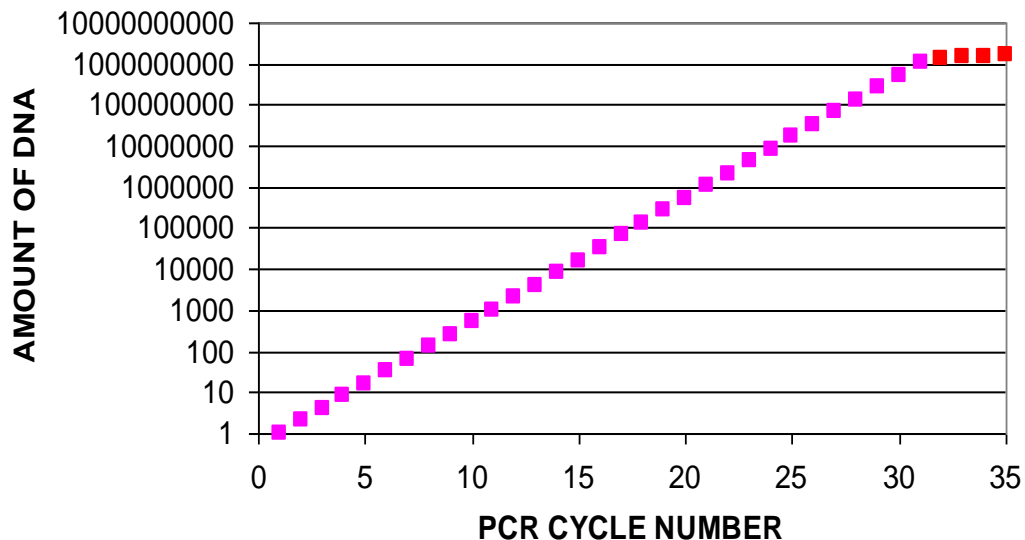


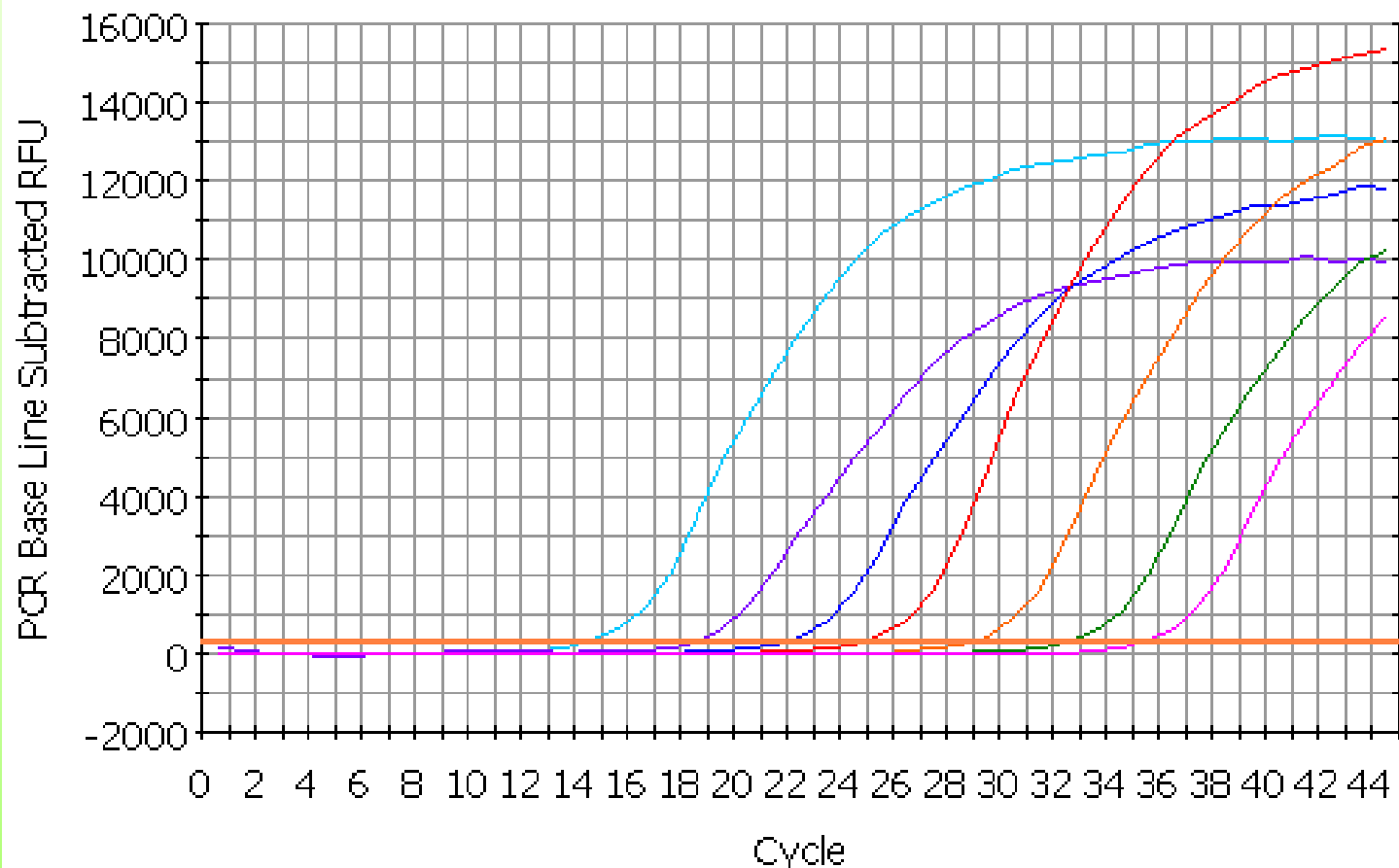




- bis zur Sättigung der PCR erfolgt DNA-Amplifikation logarithmisch

- Messung der DNA-Menge im „linearen“ Bereich





(Reihe von 10-fach Verdünnung.)

- anhand der Amplifikationskurven kann die eingesetzte DNA-Konzentration berechnet werden
- Die Kurve gibt auch Aufschluss über die Spezifität der Reaktion



# Prinzip des Ribonuclease Protection Assays

1. Isolation von Gesamt-RNA

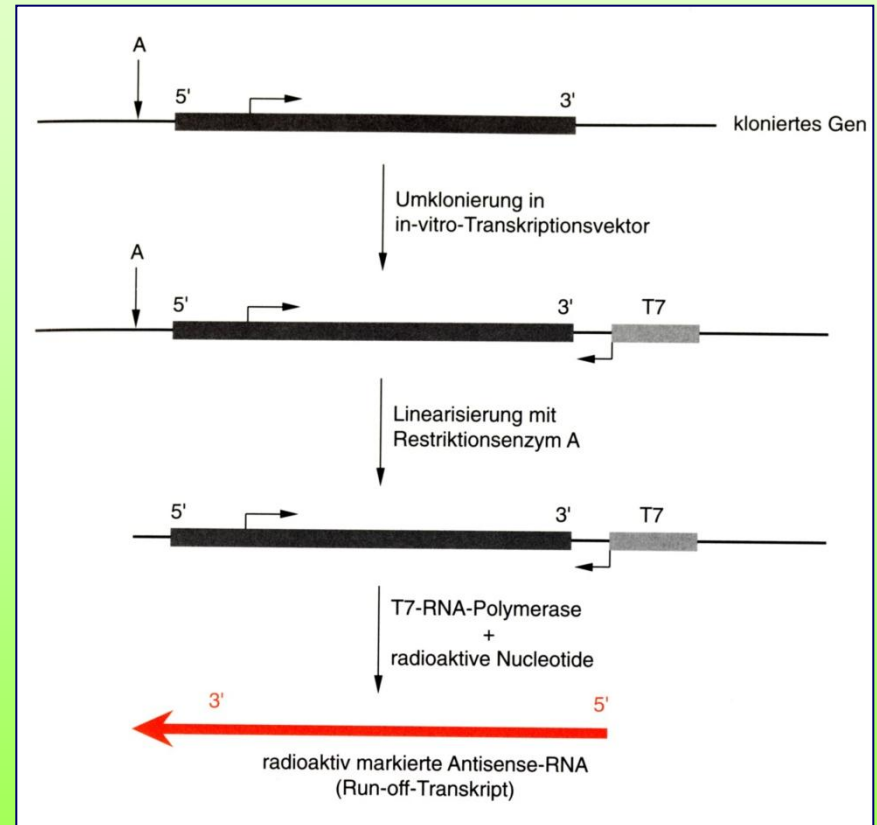
2. Herstellung einer antisense RNA -Sonde

→ **Template:**

DNA-Fragment des zu untersuchenden Gens

→ **Synthese:**

*in vitro* Transkription mit RNA-Polymerase + markierten NTPs



→ Gesamte Sonde markiert → Hohe Sensitivität!



# Prinzip des Ribonuclease Protection Assays

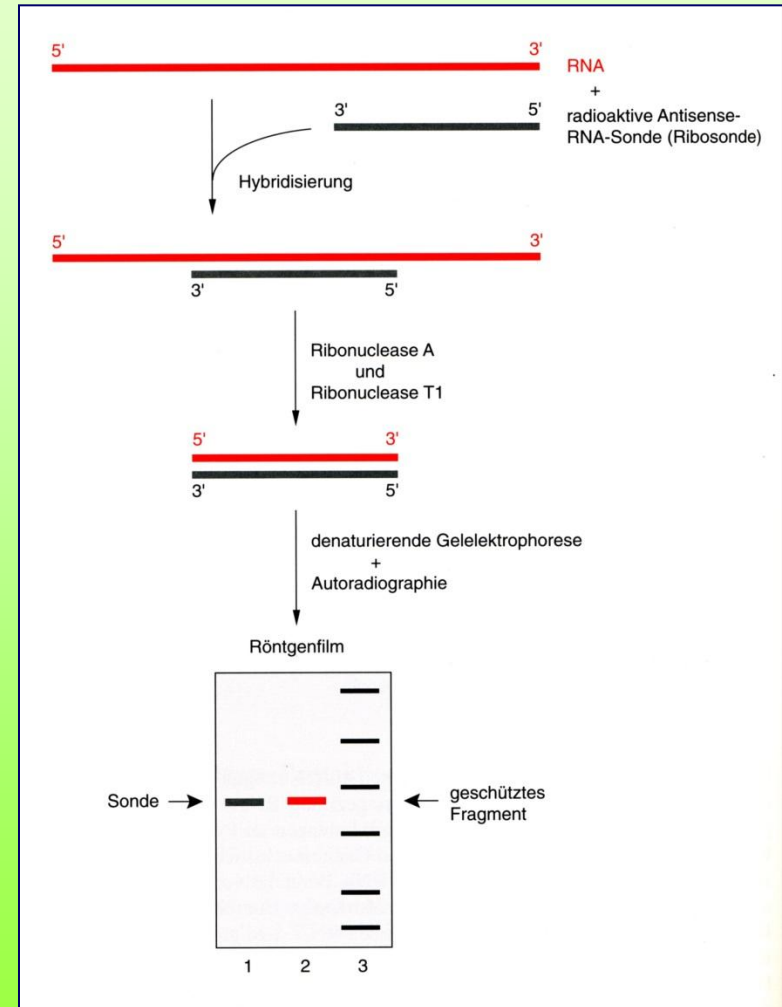
3. Hybridisierung der Gesamt-RNA mit der RNA-Sonde

4. Nuclease-S1-Behandlung:

→ Abbau einzelsträngiger RNA

→ RNA-RNA-Hybrid geschützt

5. Denaturierendes Formaldehyd-Agараosegel + Detektion



# Zusammenfassung

Methode	Anwendung
Northern-Blot	Expressionsanalyse – Transkriptgröße (Operon, Spliceformen)
RT-PCR	Expressionsanalyse
Microarray (später)	Expressionsanalyse
Ribonuclease Protection Assay	Expressionsanalyse, Kartierung von 5` - und 3` -Enden der RNA, Bestimmung von Introns
Primer Extension	Expressionsanalyse, Bestimmung des 5` -Endes und Promotors
RACE	Kartierung von 5` - und 3` -Enden der RNA
„OMICS“	Microarray bzw. RNAseq, Electronic Northern

