



Zakład Biologii Molekularnej
Materiały do ćwiczeń z przedmiotu:
„BIOLOGIA MOLEKULARNA”
Analityka Medyczna
2015

Zakład Biologii Molekularnej
Wydział Farmaceutyczny, WUM
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa



Analiza jakościowa i ilościowa RNA

Wstęp

W komórkach występują trzy główne rodzaje RNA: mRNA, tRNA, rRNA. Największą pulę RNA stanowi rRNA kodujące podjednostki rybosomów (u Eukariota o stałych sedymentacji 25-28S, 18S, 5S i 5,8S). Cząsteczki tRNA biorą czynny udział w procesie translacji dostarczając odpowiednie aminokwasy w trakcie syntezy łańcucha polipeptydowego. Z kolei mRNA stanowi matrycę dla syntezy białek funkcjonalnych i strukturalnych (1-5% całkowitego RNA komórki).

MikroRNA (miRNA) zaliczane są do endogennych, krótkich (19 - 23 nukleotydów), jednoniciowych, niekodujących cząsteczek RNA, uczestniczących w regulacji ekspresji genów. MikroRNA przyłączają się głównie do regionów 3'UTR (ang. *untranslated region*) docelowego mRNA. Skutkuje to zahamowaniem translacji lub nawet degradacją nici nukleotydowej, co przekłada się w następstwie na obniżenie ekspresji docelowego genu. Wykazano, że jedno miRNA może oddziaływać na różne mRNA jak również jedno mRNA może posiadać sekwencje komplementarne dla różnych miRNA. Szacuje się, że ponad 60% transkryptomu ssaków podlega regulacji miRNA.

Biosynteza miRNA

MiRNA powstają na matrycy genów, które przeważnie położone są w intronach. Niewielka liczba genów miRNA znajduje się w egzonach, rejonach 5'UTR i 3'UTR. Takie geny miRNA ulegają transkrypcji razem z genami „gospodarzami”. Ponadto, geny miRNA mogą znajdować się również w obszarze międzygenowym. W takiej sytuacji, ich transkrypcja przebiega z udziałem własnych promotorów i czynników transkrypcyjnych. Warto dodać, że geny miRNA mają charakter mono- i policistronowy. Biosynteza miRNA rozpoczyna się w jądrze komórkowym i ma charakter wieloetapowy. Początkowo z udziałem głównie polimerazy II RNA transkrybowany jest pri-miRNA. Przeciętny pri-miRNA złożony jest z ~ 33 nukleotydowego dwuniciowego rdzenia zawierającego sekwencję dojrzałego miRNA, który zakończony jest jednoniciową pętlą oraz jednoniciowych regionów flankujących. Pri-miRNA ulega pocięciu w swoistym mikroprocesorze złożonym z rybonukleazy III Drosha oraz białka DGCR8. W efekcie działania mikroprocesora, powstają ~ 70 nukleotydowe cząsteczki o strukturze spinki do włosów, zwane prekursorowymi miRNA (pre-miRNA). Na tym etapie, zostaje zakończona biosynteza miRNA w jądrze komórkowym, a pre-miRNA ulega transportowi przez błonę jądrową do cytoplazmy. Transport



cząsteczki pre-miRNA zapewnia Eksportyna-5, współdziałająca z kofaktorem Ran-GTP. W cytoplazmie pre-miRNA zostaje włączony do wielobiałkowego kompleksu RLC (ang. *RISC loading complex*), w którego skład wchodzi rybonukleaza III Dicer, oraz białka wiążące się z dsRNA. Enzym Dicer, rozpoznaje cząsteczkę pre-miRNA i wycina ze struktury spinki do włosów ~ 22 nukleotydowe dwuniciowe fragmenty RNA, w których budowie na końcu 3' wyróżnia się dwa

niesparowane nukleotydy. Tylko jedna nić dupleksu miRNA/miRNA* zawiera sekwencję dojrzałego miRNA. Druga nić jest nazywana nicią pasażerską. Dzięki aktywności helikaz dupleks miRNA ulega rozpleceniu, a pojedyncza nić miRNA poprzez przyłączenie do białka Ago2, zostaje włączona do kompleksu RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*). W skład kompleksu RISC wchodzi białka o aktywności helikaz, nukleaz oraz białka wiążące się z dsRNA. Jednym z głównych białek kompleksu RISC jest białko z rodziny Argonaute. Kompleks RISC przyłącza się do komplementarnych sekwencji miRNA głównie w obszarze 3'UTR mRNA. Wykazano, że do prawidłowego wiązania się miRNA z mRNA niezbędna jest komplementarność jedynie kilku nukleotydów. Region ten zwany jest regionem „seed” i stanowi obszar 2-7 nukleotydu od końca 5' w strukturze miRNA. W przypadku całkowitej komplementarności pomiędzy wiązaniem miRNA/mRNA dochodzi do zahamowania translacji na skutek rozcięcia nici mRNA. Natomiast w sytuacji niepełnej komplementarności miRNA/mRNA dochodzi jedynie do blokady mechanizmu translacji.

Rola miRNA w organizmie

MikroRNA uczestniczą w wielu procesach fizjologicznych takich jak np. hematopoeza, rozwój serca, neurogeneza, apoptoza, wzrost i proliferacja komórek a także odgrywają ważną rolę w procesach patologicznych takich jak np. nowotworzenie czy choroby układu sercowo-naczyniowego. Szczególnie warto zwrócić uwagę na znaczenie mikroRNA w procesie kancerogenezy, gdzie zarówno na etapie inicjacji i progresji nowotworu jak i przerzutowaniu duże znaczenie odgrywa obniżenie ekspresji miRNA supresorowych jak np. let-7, miR-16, miR-15 oraz wzrost ekspresji tzw. „onkomirów” jak np. miR-21, miR-221, miR-373, miR-520c.

MiRNA jako biomarker

Cechą charakterystyczną miRNA jest ich swoistość wobec danej tkanki, komórki. Obecność miRNA notuje się w różnych płynach ustrojowych takich jak: osocze, mocz, ślina, łzy, mleko. Trwają badania nad wykorzystaniem mikroRNA jako potencjalnych, oryginalnych biomarkerów diagnostycznych. MikroRNA mogą znaleźć zastosowanie jako biomarkery uszkodzenia narządów np. miRNA-208 jako wskaźnik uszkodzenia kardiomiocytów. Niektóre miRNA wykazują



zmienioną ekspresję podczas procesu patologicznego, co może być korzystne np. w diagnostyce nowotworów – w raku piersi obserwuje się wzrost ekspresji miRNA-21 i obniżenie miRNA-125-1, miRNA-125-2, miRNA-145, w raku jelita grubego stwierdzono obniżenie poziomu miRNA-143 i miRNA-145.

MiRNA jako czynnik terapeutyczny

MikroRNA może stać się również wartym uwagi czynnikiem terapeutycznym. Strategie terapeutyczne mogą opierać się na eliminacji miRNA będącego w nadekspresji, blokowaniu pri-miRNA czy wprowadzaniu miRNA, którego ekspresja jest obniżona. Z wykorzystaniem miRNA w terapii wiążą się jednak liczne problemy związane z właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi cząsteczki.

Izolacja miRNA

Otrzymanie wysokiej jakości RNA (niezdegradowanego o wysokim stopniu czystości) jest często momentem krytycznym w dalszej analizie opierającej się o wykorzystanie takich metod jak Northern blot, RT-PCR, mapowanie RNA, translacja in vitro, czy tworzenie bibliotek cDNA. W procesie obróbki RNA ważny jest dobór odpowiedniej metody homogenizacji materiału wyjściowego, dobór samej metody izolacji RNA jak i przechowywania wyizolowanego materiału.

RNA jest znacznie bardziej narażony na degradację niż kwas dezoksyrybonukleinowy. W materiale biologicznym i środowisku zewnętrznym obecne są rybonukleazy. Są to bardzo aktywne i stabilne, niewymagające dla swej aktywności kofaktorów, enzymy degradujące RNA. Ze względu na specyficzne właściwości RNaz należy poddawać je działaniu bardzo silnych związków denaturujących białka (chlorowodorek/izotiocyanian guanidyny), a sprzęt i niektóre bufony wykorzystywane do pracy z RNA traktować roztworem dietylopirowęglanu (0,1% roztwór DEPC).

Izolację miRNA można wykonać różnymi metodami. Można wśród nich wyróżnić metodę z użyciem RNeasy[®] RT oraz TRIzol. RNeasy[®] RT jest odczynnikiem, który poprzez działanie fenolu i guanidyny prowadzi do lizy komórek. Dodanie wody powoduje precipitację cząsteczek takich jak np. DNA i białko, które usuwane są z roztworu w procesie wirowania. Uzyskany supernatant traktuje się alkoholem w celu wytrącenia i oczyszczenia cząsteczek RNA.

TRIzol- Total RNA Isolation, jest mieszaniną fenolu, izotiocyanianu guanidyny i innych związków, które prowadzą do lizy komórek i inaktywacji endogennych RNaz. Pierwszym etapem izolacji RNA



jest zawieszenie materiału komórkowego/tkankowego w Trizolu. W kolejnym etapie dodawany jest chloroform, odpowiedzialny za ekstrakcję zanieczyszczeń białkowych, ale także rozdział DNA i RNA. Wirowanie w obecności chloroformu prowadzi do utworzenia się 3 warstw i tym samym rozdzielenia składników lizatu (RNA, DNA, białek). We frakcji wodnej (górnej) zatrzymuje się RNA, traktowanie następnie izopropanolem w celu wytrącenia i koncentracji. Końcowe etapy izolacji prowadzą się do osuszenia i rozpuszczenia w wodzie osadu RNA. Białka i DNA możliwe są do odzyskania w trakcie procesu izolacji RNA z fazy organicznej. Twórcą Trizolu był Piotr Chomczyński.

Nadmiar DNA w mieszaninie traktowany jest kwaśnym fenolem, alternatywnie roztwór RNA trawi się DNazą.

Jeżeli interesuje nas określona frakcja RNA (mRNA) w trakcie procedury izolacji należy uwzględnić dodatkowe etapy wymywające z preparatu pozostałe kwasy tRNA oraz rRNA. Wykorzystuje się w tym celu fakt, że cząsteczki mRNA na końcach 3' zawierają sekwencje poli(A), które mogą wiązać się z cząsteczkami poli(T) przyłączonymi do stałego podłoża (kulki magnetyczne, kolumna chromatograficzna). Cząsteczki RNA nie związane z podłożem są wymywane, natomiast oczyszczone związane z podłożem mRNA poddawane są elucji.

Elektroforeza agarozowa

Elektroforeza wykorzystuje zjawisko przemieszczania się w polu elektrycznym cząsteczek obdarzonych ładunkiem. Na szybkość migracji w polu elektrycznym mają wpływ takie czynniki jak: różnica potencjałów w polu, wielkość, kształt, ładunek i charakter chemiczny przemieszczającej się cząsteczki. Kwasy nukleinowe mają ładunek ujemny (nadany przez grupy fosforanowe) i zgodnie z nim migrują w polu elektrycznym do anody (+).

Po rozdziale elektroforetycznym całkowitego RNA najlepiej widoczne na żelu są dwie frakcje rRNA (u myszy 28S oraz 18S). Intensywność prążków daje nam informacje na temat jakości preparatu RNA: ich zanikanie świadczy o postępującej degradacji RNA. Niewielkie ilości wyizolowanego mRNA ze względu na swoją wielkość po rozdziale całkowitego RNA mogą nie być widoczne.



Analiza spektrofotometryczna kwasów nukleinowych

Spektrofotometryczne oznaczenie zawartości substancji rozpuszczonej w roztworze polega na przepuszczeniu przez badany roztwór wiązki światła o znanej długości fali. Ilość energii transmitowanej przez próbkę jest rejestrowana przez fotokomórkę umieszczoną „na wyjściu” ścieżki. Zgodnie z prawem Lamberta-Beera istnieje liniowa zależność pomiędzy absorbancją A (określaną jako gęstość optyczna OD), a stężeniem makrocząsteczek, która wyraża się wzorem:

$A=OD=\text{molowy współczynnik absorpcji} \cdot \text{stężenie} \cdot \text{grubość warstwy absorbującej (kuwety)}$

Białka i kwasy nukleinowe pochłaniają światło w zakresie UV(210-300nm), przy czym maksimum absorpcji dla DNA i RNA znajduje się przy wartości 260nm, natomiast dla białek wynosi 280nm. Ze względu na fakt, że częściowe pochłanianie światła dla DNA, RNA ma miejsce w zakresie 280nm, a dla białek przy długości fali 260, daje nam to możliwość oszacowania czystości preparatu dokonując prostej kalkulacji dla stosunku absorbancji 260nm/280nm. Dla czystego, nie zanieczyszczonego białkami, ani pochodnymi fenolu, RNA, wartość referencyjna wynosi ok.2,00. Dla warstwy absorbującej 1cm, przy długości fali 260nm, absorbancja $A=1$ odpowiada ok.40 $\mu\text{g/ml}$ RNA.

$$C_{\text{RNA}} = 40 * A(260\text{nm}) * R$$

gdzie:

R - rozcieńczenie

Absorbancja [$A(260\text{nm})$] równa 1, odpowiada 40 μg RNA

C_{RNA} – stężenie RNA



Protokół izolacji i analizy jakościowej i ilościowej frakcji RNA całkowitego z frakcją mikroRNA z hodowli komórkowej

Izolacja RNA

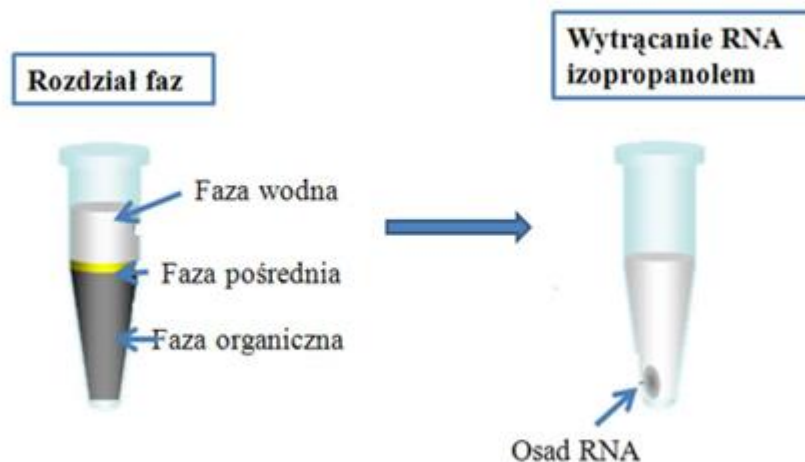
Potrzebne materiały i odczynniki:

1. Odwirowany osad komórek zawieszonych w RNAlater.
2. TRIZOL
3. Chloroform
4. Izopropanol
5. 75% etanol
6. Woda (wolna od RNaz, woda do wstrzykiwań)
7. Eppendorfy
8. Vortex
9. Wirówka

UWAGA!!! Wykonanie procedury izolacji należy bezwzględnie przeprowadzić w rękawiczkach!

1. Osad komórek zawiesić w 0,5 ml Trizolu (dobrze „przepipetować”)
2. Inkubować 5 min w temp pokojowej (RT)
3. Dodać 100 ul chloroformu i wytrząsać w rękę przez 15s – uwaga, „leje” się z pipety – niskie napięcie powierzchniowe
4. Inkubować 2-3 min w RT
5. Wirować 11 500 rpm / 15 min / 4°C
6. **Górną wodną fazę przenieść do nowej probówki**
7. Dodać 0,25 ml izopropanolu i delikatnie wymieszać, obracając probówkę
8. Inkubować 10 min w RT
9. Wirować 11 500 rpm / 10 min / 4°C
10. Po wirowaniu obserwować osad na dnie probówki i uważnie odlać supernatant, nie naruszając osadu
11. Przemyć osad RNA dodając 0,5 ml 75% etanolu – jeżeli po dodaniu etanolu, osad wciąż będzie obecny na dnie probówki, próby należy delikatnie zworteksować – do momentu oderwania się osadu z dna probówki

12. Wirować 9 000 rpm / 5 min / 4°C
13. Odrzucić supernatant obserwując osad RNA
14. Osad RNA suszyć na powietrzu, pozostawiając probówkę otwartą i ustawiając ją do góry dnem na bibule przez 10 – 20 min
15. RNA zawiesić w 20µl wody (wolnej od RNaz, woda do wstrzykiwań).



Ryc. 1. Rozdział faz podczas izolacji RNA

Ocena jakościowa RNA – elektroforeza w żelu agarozowym

UWAGA!!! Bromek etydyny jest silnym kancerogenem! Należy bezwzględnie pracować w rękawiczkach!

Potrzebne materiały i odczynniki:

1. Bufor do elektroforezy TAE 1x (10x TAE: 40mM Tris, 0,12 % kwas octowy, 1mM EDTA pH 8,0)
2. Agaroz
3. Bromek etydyny
4. Obciążnik (10x obciążnik: 0,25% bromophenol blue, 0,25% xylene cyanol, 20% ficoll typ 400)
5. Saneczki, grzebienie i komora elektroforetyczna
6. Wzmacniacz prądu

7. Kuchenka mikrofalowa

Przygotowanie żelu agarozowego

1. Saneczki włożyć w formę i wyważyć jej równowagę
2. W saneczki włożyć grzebień
3. Przygotować żel agarozowy 1,2 % w objętości 70 ml (małe saneczki) lub 140 ml (duże saneczki)

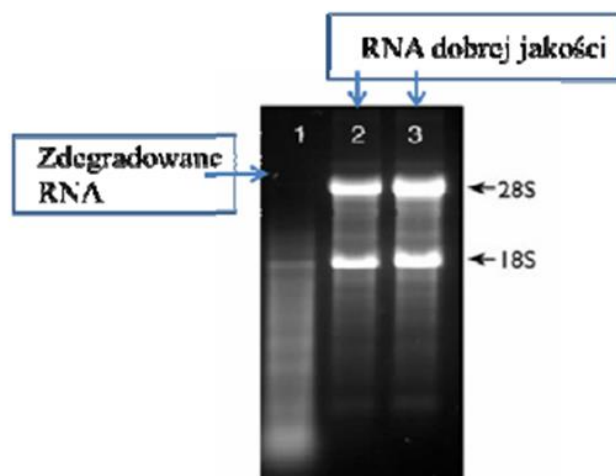
Miejsce na obliczenia

4. Rozcieńczyć buforu TAE 50x, tak aby przygotować roztwór TAE 1x

Miejsce na obliczenia

5. Odpowiednia naważkę agarozy rozpuścić na gorąco w buforze TAE 1x
6. Klarowny roztwór agarozy ochłodzić do temp ok 50°C
7. Pod wyciągiem, do roztworu agarozy dodać 3µl bromku etydyny, zamieszać
8. Wylać żel na saneczki, uważając by nie pojawiły się bąble powietrza
9. żel zastyga ok 20 min

Elektroforeza RNA w żelu agarozowym



Ryc. 2. Przykładowy rozdziel elektroforetyczny RNA w żelu agarozowym.



1. Z żelu wyciągnąć grzebień i przenieść saneczki do komory elektroforetycznej
2. Napelnić komorę buforem TAE 1x, w ilości która zapewni pokrycie żelu
3. Próby RNA należy inkubować w temp 70°C przez 1 min, a następnie umieścić na lodzie
4. Przygotować próby do nałożenia na _el: **10 µl próby + 5 µl obciążnika**,
5. wymieszać przez przepipetowanie w probówce i nałożyć na żel – jeżeli pozostał płyn na ściance próbówki, należy próbę zwirować
6. Elektroforezę prowadzić przez 30-40 min / 80V
7. Po zakończonej elektroforezie przeanalizować wynik w świetle UV

Pomiar spektrofotometryczny

1. Dokonać pomiaru spektrofotometrycznego z użyciem spektrofotometru kropelkowego
2. Przeanalizować wyniki

260nm –

280nm –

260/280 –

260/230 –

Stężenie RNA –