

# Biochemie

## Vertiefungspraktikum I

RNA-Isolierung und Charakterisierung

08.05.2000 bis 19.05.2000

**Verantwortlich: Prof. Dr. Hovemann**  
**Betreuer: Arnd Richardt, Stefanie Wagner,**  
**Raffael Kettler**

Sven Enterlein  
108 097 236 174

## Gliederung:

	Ergebnisse und Auswertung	6
	Agarose/Formaldehyd-Gel	6
	Einleitung	6
	Durchführung	6
	Ergebnisse und Auswertung	7
<b>I</b>	<b><i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>2</b>
	Einleitung	2
	Entwicklungszyklus	2
	Geruchswahrnehmung, Signaltransduktion	2
<b>II</b>	<b>RNA-Isolierung mit der Guanidinium- isothiocyanat/CsCl- Zentrifugationsmethode</b>	<b>3</b>
	Durchführung	3
	Besondere Maßnahmen beim Arbeiten mit RNA	3
	RNA-Isolierung	3
	RNA-Fällung	3
	Beobachtungen	4
<b>III</b>	<b>RNA-Isolierung mit dem Trizol<sup>®</sup>- Verfahren</b>	<b>4</b>
	Durchführung	4
	RNA-Isolierung	4
	RNA-Fällung	4
<b>IV</b>	<b>Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration</b>	<b>4</b>
	Einleitung	4
	Durchführung	4
	Ergebnisse und Auswertung	5
<b>V</b>	<b>Anreicherung der poly(A)<sup>+</sup>- Fraktion</b>	<b>5</b>
	Einleitung	5
	Durchführung	5
	Anmerkung	5
<b>VI</b>	<b>Gelelektrophoretische Untersuchungen</b>	<b>6</b>
	Agarosegel	6
	Einleitung	6
	Durchführung	6
<b>VII</b>	<b>Northern Blot und Hybridisierung</b>	<b>7</b>
	Einleitung	7
	Durchführung	7
	Northern Blot	7
	Färbung der Markerbande	8
	Hybridisierung mit <sup>32</sup> P-markierter DNA-Sonde	8
	Autoradiographischer Nachweis	8
	Ergebnisse und Auswertung	8
<b>VIII</b>	<b>In situ Nachweis von RNA in Gewebe</b>	<b>8</b>
	Einleitung	8
	Durchführung	9
	Herstellen der RNA-Sonde	9
	Dot Blot	9
	Herstellen der Gewebeschnitte	9
	Hybridisierung	9
	Detektion	10
	Ergebnisse und Auswertung	10
	Dot Blot	10
	Gele	10
	Gewebeschnitte	11
<b>IX</b>	<b>Alternative Methoden</b>	<b>11</b>
	Denaturierung von RNA mit Glyoxal/DMSO und Northern- Hybridisierung	11
	Northern-Hybridisierung von unfraktionierter RNA mit der Slot Blot- Technik	12
	Durchführung	12
	Besonderheiten, Gefahren	12

# I *Drosophila melanogaster*

## Einleitung

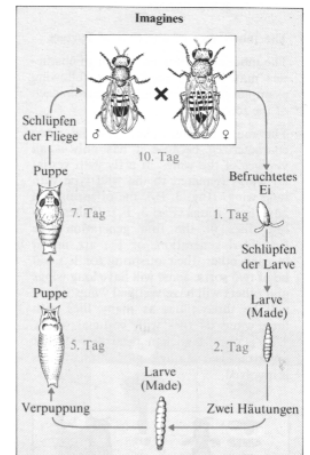
Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist einer der tierischen Versuchsobjekte in der Vererbungslehre. Seit Anfang des 20. Jahrhunderts arbeiten klassische Genetiker mit diesem Tier, wodurch es zu einem der bestuntersuchten Objekte gehört. Im Vergleich zu Mikroorganismen, die heutzutage zum Großteil die Fruchtfliege abgelöst haben, lassen sich einige Vorteile aufzählen:

1. Es handelt sich um einen eukaryoten Organismus.
2. Die Generationenfolge ist relativ schnell (10 Tage bei 25 °C).
3. Die Fliegen sind leicht zu züchten und haben bis zu 300 Nachkommen pro Paar.
4. Mutationen sind teilweise makroskopisch zu erkennen.
5. Die im haploiden Zustand vorliegenden vier gut zu unterscheidenden Chromosomen erleichtern cytologische Untersuchungen.

## Entwicklungszyklus

Abb. 1 gibt den Ablauf der Entwicklung *Drosophila m.* wieder.

Nach der Befruchtung werden die weiß-gelblichen Eier auf dem Nährboden abgelegt. Sie sind etwa 0.5 mm groß und haben zwei fadenartige Anhänge. Zum Zeitpunkt der Eiablage hat die Embryonalentwicklung schon begonnen; sie dauert insgesamt 24 Stunden. Die dann schlüpfenden Larven bohren sich in den Nährboden und wachsen schnell. Es werden insgesamt zwei Häutungen durchlaufen, da die Haut nicht mitwächst. Die drei Larvestadien dauern etwa 100 Stunden. Danach verlassen die Larven den Nährboden und verpuppen sich an der Wand des Zuchtgefäßes. Die Puppen sind tönchenförmig und färben sich von hell zu braun. Diese Periode (Puppenruhe) dauert vier bis fünf Tage. Die Fliegen schlüpfen nach abgeschlossener Metamorphose und werden dann Imago genannt. Die Flügel sind zuerst noch zusammengefaltet, die Körperfarbe insgesamt hell. Erst einige Stunden später entfalten sich die Flügel, und der Körper ist ausgefärbt. Schon nach sechs bis acht Stunden sind die Tiere zeugungsfähig.



**Abb. 1:** Entwicklungszyklus der Fruchtfliege. (Quelle: Hafner/Hoff: "Genetik", S. 36, 1994, Schroedel)

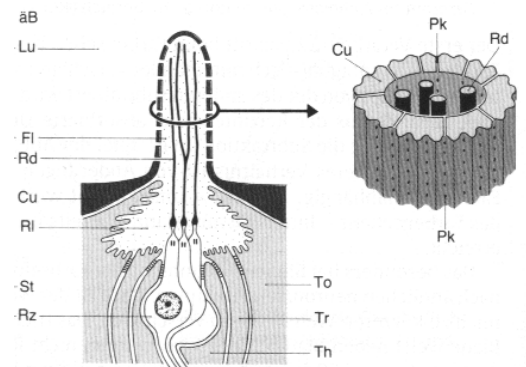
## Geruchswahrnehmung, Signaltransduktion

Das Geruchssinnesorgan bei Insekten ist die Antenne (Abb. 2). Sie wirken wie ein Molekularsieb: Die Geruchsstoffe gelangen durch die Poren in die Lymphe und von dort aus diffundieren sie zu den Rezeptoren. Der Transport durch die Poren erfolgt möglicherweise über einen Carrier.

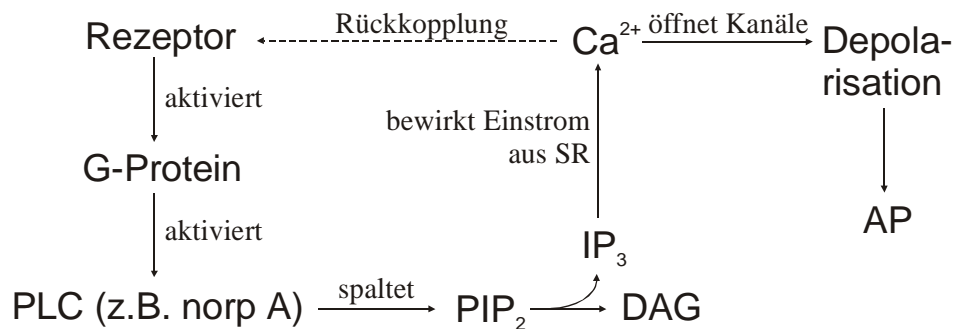
Der Geruchsrezeptor DOR 67, der in diesem Versuch untersucht werden sollte, wurde im Januar 1999 erstmals charakterisiert. Deshalb ist auch noch nicht sehr viel über den genauen Wirkungsmechanismus bekannt. Seine Entdeckung war in sofern etwas Besonderes, da die Isolation mit Hilfe von Computeralgorithmen erfolgte. Man suchte zwei der insgesamt sieben Transmembranregionen, die bei *Drosophila* bisher noch nicht entdeckt worden waren.

Da bei sehr vielen Molekülen ein Aktionspotential ausgelöst wird, ist die Frage der spezifischen Geruchswahrnehmung noch ungeklärt. Eine Möglichkeit wäre, dass unterschiedlich affine Rezeptoren aufgrund ihrer Lokalisation eine bestimmtes Muster an Signalen für einen bestimmten Stoff aussenden. Sämtliche Aktionspotentiale werden auf den Antennenlobus projiziert. Die Abschaltung des Signals ist mechanistisch noch nicht bekannt; man konnte jedoch eine Rückkopplung der Calciumionen auf den Rezeptor nachweisen.

Die Abbildung auf der nächsten Seite (Abb. 3) stellt grob den Ablauf der Signalübertragung dar. Die wirklichen Abläufe sind noch nicht gänzlich erforscht und sehr umfangreich.



**Abb. 2:** Olfaktorische Sinnesorgane bei Insekten (basiconische Sensillen).  
Cu: Cuticula; FI: Lymphe; Lu: Luft; Pk: Porenkanal; Rd: Rezeptordendriten; Rz: Rezeptor; Th: thecogene Zelle; To: tormogene Zelle; Tr: trichogene Zelle  
(Quelle: Wehner/Gehring: "Zoologie", S. 430, 23. Auflage 1995, Thieme)



**Abb. 3:** Schematischer Ablauf der Signaltransduktion nach der Bindung eines Duftstoffes an den Rezeptor DOR 67. PIP<sub>2</sub>: ; IP<sub>3</sub>: Inositoltriphosphat; DAG: Dialkylglycerol; SR: sarkoplasmatisches Reticulum; AP: Aktionspotential

## II RNA-Isolierung mit der Guanidinium-isothiocyanat/CsCl-Zentrifugationsmethode

### Durchführung

#### Besondere Maßnahmen beim Arbeiten mit RNA

Beim Umgang mit RNA ist besondere Sorgfalt angebracht. RNAs sind – im Gegensatz zu DNAs – sehr empfindlich gegenüber alkalischer Hydrolyse. Hinzu kommt, dass RNasen überall vorhanden sind, die unter schwierigsten Bedingungen noch in der Lage sind, die RNAs zu verdauen. Es ist daher immer mit Handschuhen zu arbeiten. Die Glasgefäße müssen im Ofen bei über 180 °C ausgebacken und die Lösungen sterilisiert werden. Wenn Wasser eingesetzt wird, muss dies ebenfalls autoklaviert und am besten mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt worden sein; dadurch ist eine RNase-Freiheit garantiert.

#### RNA-Isolierung

Bei diesem Versuchsteil wurden zwei Ansätze parallel gemacht. Die eingesetzte Menge war gleich, ebenso die Durchführung. Im Folgenden wird nur die Behandlung eines Ansatzes beschrieben.

Ein Porzellanmörser wurde in flüssigem Stickstoff zusammen mit dem Gewebematerial (hier: Larven) vorgekühlt. Es wurden etwa zwei Gramm (genau 1.9 g) Larven abgewogen und unter Stickstoffkühlung fein zermörsert. Das feine Pulver wurde mit einem gekühlten Spatel in einen Potter gegeben, in dem 19 ml GITC-Puffer und 133 µl Mercaptoethanol vorgelegt waren. Das Gemisch wurde unter Eisbadkühlung durch etwa 20maliges Ein- und Austauschen des Potterstabes homogenisiert. Das Homogenat wurde auf zwei Plastikzentrifugenröhrchen verteilt und in einem HB-4 Rotor für 10 min bei 10,000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen Erlenmeyerkolben gegossen, das Volumen abgeschätzt (22 ml) und 4.4 g CsCl zugegeben.

In zwei SW40 Zentrifugenröhrchen wurden je 2.5 ml CsCl/EDTA-Lösung vorgelegt und vorsichtig mit dem Überstand überschichtet. Dabei wurden die Röhrchen bis knapp unter den Rand befüllt, um Verzerrungen bei der Zentrifugation zu vermeiden. Die Zentrifugation erfolgte in der Ultrazentrifuge über Nacht (22 h 14 min) bei 32,000 rpm und 4 °C.

Am nächsten Morgen wurde der Überstand vorsichtig entfernt (einschließlich der DNA-Bande). Die Böden der Zentrifugenröhrchen wurden abgeschnitten, und das RNA-Pellet in je ein Eppendorfgefäß mit Schraubverschluss (im weiteren Schraubeppi genannt) überführt. Dazu wurde es in 500 µl TE/SDS-Puffer resuspendiert.

#### RNA-Fällung

Die Schraubeppis mit den gelösten Pellets wurden kurz gevortext und fünf Minuten im Eppendorfschüttler bei 65 °C erhitzt. Es folgte eine Extraktion mit 890 µl eines 1:1 Phenol/Chloroform-Gemisches: Zugabe des Gemisches, ausgiebiges Vortexen, zweiminütiges Abzentrifugieren in der Eppifuge und Abnahme der oberen (wässrigen) Phase. Um die Phenolreste zu entfernen, wurde die Phase mit 500 µl Chloroform extrahiert. Nach der Zugabe von 50 µl 2 M NaOAc-Lösung pH 5.2 wurde die RNA über Nacht mit 1.1 ml Ethanol bei –20 °C gefällt.

Vor der Verwendung wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und das Pellet in 100 µl aqua bidest resuspendiert.

## Beobachtungen

Die Gewebeproben ließen sich gut zermörsern. Sobald das Pulver mit etwas wärmerem in Kontakt kam, blieb es kleben und taute auf. Deshalb blieb immer etwas an den Gefäßwänden zurück.

Nach der Ultrazentrifugation war eine trübe Bande etwa einen Zentimeter über dem Boden des Röhrchens sichtbar. Es handelte sich dabei um DNA aus den Geweben. Das RNA-Pellet am Boden war nahezu farblos und gelartig.

## III RNA-Isolierung mit dem Trizol<sup>®</sup>-Verfahren

### Durchführung

#### RNA-Isolierung

Die Isolierung wurde mit Puppen zweier unterschiedlicher Phänotypen durchgeführt: Zum einem dem Wildtyp (wt), zum anderen einer Mutante (A50). Beide Ansätze wurden gleich behandelt.

Wie beim vorigen Verfahren wurden das Gewebematerial und die Mörser in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Von beiden Phänotypen wurden 2.0 g abgewogen und im Mörser fein zerrieben.

In zwei 50 ml Greinerröhrchen wurden je 10 ml Trizol vorgelegt und das Gewebepulver schnell zugegeben. Durch dreimaliges Zerkleinern für eine Minute mit dem Ultraturax wurde eine feine Verteilung erreicht. Die Dispersion wurde 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend mit 2 ml Chloroform gut geschüttelt, um die Reaktion zu stoppen. Die Lösung wurde in ein silikonisiertes (damit die RNA nicht am Glas haften bleibt) Corex-Röhrchen überführt und drei Minuten bei RT stehen gelassen. Die Röhrchen beider Ansätze wurden mit Chloroform gegeneinander austariert und dann bei 12,000 rpm für 15 min (4 °C) zentrifugiert.

#### RNA-Fällung

Der Überstand wurde mit jeweils 2.5 ml Isopropanol und einer Lösung aus 0.8 M NaCitrat mit 1.2 M NaCl versetzt. Nach zehn Minuten Inkubation bei RT wurde ebenso lang bei 4 °C und 12,000 rpm zentrifugiert.

Das Pellet wurde mit 10 ml 70%igem Ethanol gewaschen und fünf Minuten bei 7,500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgossen und das Pellet an der Luft getrocknet. Danach wurde es in 1 ml aqua bidest aufgenommen und im Eppendorfschüttler bei 65 °C in Lösung gebracht. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Probe auf Eis gelagert.

Die Bestimmung der Reinheit (s. Auswertung S. 5) zeigte, dass die Proben durch Phenol verunreinigt waren. Deshalb wurden die Ansätze auf je zwei Schraubepipis aufgeteilt, mit 50 µl NaOAc versetzt und bis zum Rand mit Ethanol aufgefüllt. Nach der Fällung wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und die RNA in 1 ml aqua bidest gelöst.

## IV Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

### Einleitung

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Konzentration an Nukleinsäuren einer Probe, also auch dem Reinheitsgrad, kann das Verhältnis der optischen Dichten bei 260 und 280 nm herangezogen werden. Bei 280 nm absorbieren die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren von Proteinen, bei 260 nm die Basen der Nukleinsäuren. Empirisch ermittelt wurde eine Konzentration von 40 µg RNA/µl, wenn die Absorption bei 260 nm 1.0 entspricht. Danach ergibt sich folgende Formel zur Konzentrationsberechnung:

$$c_{\text{RNA}} = \frac{E_{260} \times VF \times 40}{V}$$

Die Einheit der Konzentration ist µg/µl. *VF* ist der Verdünnungsfaktor der gemessenen Probe,  $E_{260}$  die Extinktion bei 260 nm und *V* das gemessene Volumen.

Ebenfalls empirisch ist der Wert, der für eine saubere RNA-Probe als Verhältnis von  $E_{260} / E_{280}$  aufgestellt wurde. Ist das Verhältnis 1.8, so ist die Probe sehr rein.

### Durchführung

Von jeder der isolierten RNA-Fractionen wurde die optische Dichte bestimmt. Tabelle 1 (Ergebnisse und Auswertung) gibt die eingesetzten Volumina an, die zu 1 ml aqua bidest pipettiert wurden. Die Original Ausdrücke (bzw. deren Kopien) sind als Anhang 1 angeheftet.

Am Photometer wurde das Programm zur RNA-Bestimmung eingestellt.

### Ergebnisse und Auswertung

Durch das Programm des Photometers wurden automatisch die Extinktionen bei 260 und 280 nm gemessen und das Verhältnis berechnet. Auch die Konzentration der RNA (in der Küvette) konnte so direkt abgelesen werden. Um die tatsächliche Konzentration in der Probe zu bestimmen, muss lediglich die ausgegebene Konzentration  $c$  durch das eingesetzte Volumen der Probelösung  $V$  geteilt werden:

$$c_{\text{Probe}} = \frac{c}{V} \times 1 \text{ ml}$$

Ansatz	Emb 1	Emb 2	Emb 3	Emb 4	WT	A50
V/ $\mu\text{l}$	10	1	1	1	5	5
c/ $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	7.4	5.7	20	16	18	13
$E_{260} / E_{280}$	2.079	1.844	1.969	1.928	2.275	2.201

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Extinktionsmessungen. Die Berechnung des Verhältnisses wurde automatisch durchgeführt.

Die Gehalte an RNA sind recht unterschiedlich. Bei den Proben, die die Embryonen als Ausgangsmaterial hatten, variiert der Wert zwischen 7.4 und 20  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Diese Unterschiede können durch unzureichendes Homogenisieren der RNA-Lösung entstanden sein. Die Reinheit ist – bezogen auf das Verhältnis  $E_{260} / E_{280}$  – akzeptabel. Während Emb 1 nur einen geringen RNA-Gehalt und eine nicht ganz so gute Reinheit aufweist, ist das Verhältnis  $E_{260} / E_{280}$  bei Emb 2 sehr gut. Aber leider ist der Gehalt an RNA hier noch niedriger. Für den Hybridisierungsansatz wurde Probe Emb 3 verwendet, da sie ähnliche Reinheit wie Emb 4 zeigt, aber einen etwas höheren Gehalt an RNA.

Die Gehalte der aus den Puppen extrahierten RNA ist in etwa gleich, ebenso die Reinheit. Das Verhältnis  $E_{260} / E_{280}$  liegt bei diesen Proben insgesamt höher, da noch Phenol in den Proben vorhanden war. Fragwürdig ist dadurch auch der Wert für die RNA-Konzentration. Aus diesem Grund wurden wie in der Durchführung unter III (RNA-Fällung) beschrieben aufgereinigt.

## V Anreicherung der poly(A)<sup>+</sup>-Fraktion

### Einleitung

In unserem Versuch sind wir an messenger RNAs interessiert. Diese weisen gewöhnlich ein Cap auf, das aus vielen As besteht. Anhand dieses Merkmals können die mRNAs größtenteils von anderen (z.B. ribosomalen) getrennt werden. Eine der am häufigsten angewandten Methoden ist die Affinitätschromatographie entweder an einer Säule oder an Latexkügelchen. An die feste Phase ist entweder poly(U) oder oligo(dT) gebunden, das mit dem komplementären poly(A) hybridisieren kann.

### Durchführung

Von der Probe Emb 3 wurden 25  $\mu\text{l}$  zu 475  $\mu\text{l}$  aqua bidest pipettiert, um eine RNA-Menge von 500  $\mu\text{g}$  zu erhalten. Es wurden 500  $\mu\text{l}$  OBB Buffer zugegeben. Die Latexkügelchen der OligoTex<sup>®</sup>-Suspension wurden auf 37 °C im Eppendorfschüttler erwärmt und resuspendiert. Dann wurden 30  $\mu\text{l}$  davon zu dem Ansatz pipettiert und auf dem Vortex gut vermischt.

Im Eppendorfschüttler wurde drei Minuten auf 70 °C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNAs zu zerstören. Zur Hybridisierung an die Festphase wurde zehn Minuten bei RT stehen gelassen. Die Kügelchen, die nun mit der RNA beladen waren, wurden danach durch Zentrifugation (2 min bei 4 °C und 14,000 rpm) sedimentiert; der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Anschließend wurde zweimal mit 1 ml OW2 Waschpuffer gewaschen (Resuspendieren und Abzentrifugieren); dabei ging aus Versehen ein Teil der Lösung (ca. 40%) verloren. Die Überstände wurden verworfen.

Um die gebunden RNA-Moleküle von der Festphase abzutrennen, wurde das Pellet im Thermoblock bei 70 °C in 50  $\mu\text{l}$  OEB Puffer resuspendiert und danach zwei Minuten bei 14,000 rpm (4 °C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein auf Eis gelagertes Schraubepi überführt. Die Elution wurde noch zweimal mit je 25  $\mu\text{l}$  OEB Puffer wiederholt und die Überstände vereinigt.

### Anmerkung

Bei der Durchführung wurde zu Beginn ein falscher Ansatz gemacht: Anstatt der 0.5 ml aqua bidest wurde 1 ml angesetzt. Diese Probe wurde jedoch als Gesamt-RNA auf das denaturierende Gel aufgetragen.

## VI Gel elektrophoretische Untersuchungen

### Agarosegel

#### Einleitung

Mit Hilfe dieser nicht denaturierenden Gelelektrophorese sollen die extrahierten RNAs auf ihre Qualität hin untersucht werden. Die Intensität der Banden gibt zudem Aufschluss über den Gehalt.

#### Durchführung

Es wurde ein 1%iges Agarosegel angesetzt. Die Proben wurden wie folgt aufgetragen:

Tasche	1	2	3	4	5	6	7
Probe	Emb 1	Emb 2	Emb 3	Emb 4	A50	WT	Marker <sup>1</sup>
V <sub>Probe</sub>		5 µl			10 µl		10 µl
V <sub>Puffer</sub>		10 µl			5 µl		--

<sup>1</sup>Marker:  $\lambda$  Hind III geschnitten

Das Gel lief eine Stunde bei 100 V.

#### Ergebnisse und Auswertung

Ein Photo des Gels ist als Abb. 4 eingefügt. Man erkennt deutlich Banden bei Emb 1, Emb 2 und Emb 4; in der dritten Spur ist nichts zu erkennen. Mit großer Wahrscheinlichkeit wurde vergessen, die RNA in den Probenpuffer zu pipettieren, da auch bei einem RNase-Verdau zumindest Fragmente sichtbar sein müssten. Ansonsten sind die Intensitäten qualitativ so, wie man sie aus den photometrischen Messungen erwartet hatte. Dass hauptsächlich eine Bande zu sehen ist, kann an den nicht denaturierenden Bedingungen liegen; alle RNAs liegen als partielle Doppestränge vor und können so nicht gut getrennt werden.

Die Spuren der RNA aus dem Puppengewebe (5 und 6) zeigen eine Bande auf gleicher Höhe, die allerdings wesentlich schwächer ist. Außerdem ist das Phenol als slanggezogener Streifen im Hintergrund gut zu erkennen. Wie schon zuvor angemerkt, ist die tatsächliche RNA-Konzentration geringer, als durch die photometrische Messung ermittelt worden ist.

Die Banden des Markers sind nur schwach zu erkennen. Sie liegen wesentlich weiter am Anfang als die der RNA-Proben. Es scheint sich demnach um sehr viel kleinere RNA als DNA-Moleküle zu handeln.

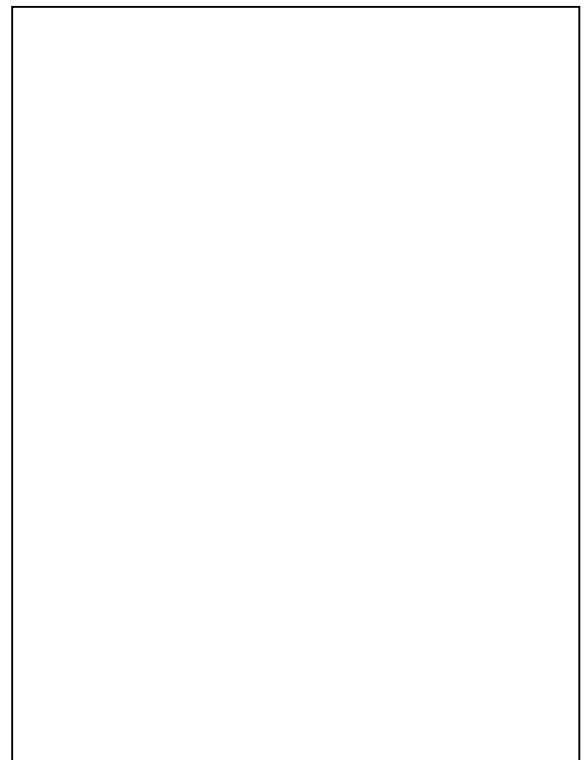


Abb. 4: Aufnahme der Agarose-Gelelektrophorese.

### Agarose/Formaldehyd-Gel

#### Einleitung

Entgegen dem zuvor beschriebenen Trennverfahren ist diese Gelelektrophorese denaturierend. Das bedeutet, dass die RNA-Moleküle vollständig einzelsträngig vorliegen. So ist eine reproduzierbare Auftrennung nach Molekulargröße (und nicht nach -Struktur) möglich.

Die Denaturierung erfolgt durch Formaldehyd, wobei die genauen Mechanismen noch unbekannt sind. Mit zunehmendem Formaldehydgehalt ist die Denaturierung effizienter, und das Gel kann länger laufen, aber es wird auch spröder.

Anstatt einer Färbung wird mit dem Gel ein Northern Blot durchgeführt, um die gesuchte RNA spezifisch nachweisen zu können.

#### Durchführung

Für das Gel wurden 1.2 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben eingewogen, 10 ml 10x FA Puffer zugefügt und mit RNasefreiem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Agarose wurde in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung erhitzt. Vor der weiteren Verwendung wurde die Lösung im Wasserbad

auf 65 °C temperiert. Es wurden 1.8 ml Formaldehyd und 1 µl Ethidiumbromid zupipettiert. Die fertige Lösung wurde in eine Gelkammer mit Kamm gegossen und ca. eine Stunde lang zum Erstarren stehen gelassen. Danach wurde das Gel in eine mit 1x FA Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt, mit demselben Puffer überschichtet, und der Kamm entfernt.

Die doppelsträngigen RNAs wurden im Eppendorfschüttler für 5 min bei 65 °C geschmolzen und durch Schocken auf Eis am Rehybridisieren gehindert. Dann wurden die Proben aufgetragen:

Tasche	1	2	3	4
Probe	Marker	poly(A) <sup>+</sup>	poly(A) <sup>-</sup>	Gesamt-RNA
V <sub>Probe</sub>	6 µl	16 µl	8 µl	16 µl
V <sub>Puffer</sub>	--	4 µl	12 µl	4 µl

Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V über eine Stunde.

### Ergebnisse und Auswertung

Bei diesem Versuchsteil wurde das Gel nicht fotografiert, sondern lediglich der Blot ausgewertet (Abb. 6).

## VII Northern Blot und Hybridisierung

### Einleitung

Mit dem Northern Blot wurde eine Methode entwickelt, die der Isolierung von DNA aus einem Gel gleicht; mit dem Unterschied, dass RNA aus dem Gel extrahiert werden soll.

In Gelen, die zur Auftrennung von Nukleinsäurefraktionen dienen, sind die Moleküle nicht mehr frei zugänglich. Oft ist es aber wünschenswert, mehr als nur die relative Größe der Fragmente zu kennen. So ist man ebenfalls an der Spezifität der einzelnen Banden interessiert. Der Northern Blot bietet für RNA-Gele dafür eine Möglichkeit: Durch den Transfer der im Gel enthaltenen Moleküle auf eine Membran (Nitrocellulose oder Nylon) werden die Moleküle wieder frei zugänglich. Es können dann spezifische Hybridisierungen vorgenommen werden, die dann Rückschlüsse auf die Art der RNA zulassen.

Bei der Durchführung gibt es mehrere Möglichkeiten. Zwei häufig eingesetzte Verfahren sind der Elektroblot und der Kapillarblot. Beim ersten ist die treibende Kraft ein elektrisches Feld, durch welches die negativ geladenen RNA-Moleküle in Richtung Membran bewegt werden. Im Falle des Kapillarblots nutzt man die Kapillarwirkung von Filterpapier aus, um einen gerichteten Sog zu erzeugen. Letztere Version wurde in diesem Versuch durchgeführt. Abb. 5 zeigt schematisch den Aufbau des Blots.

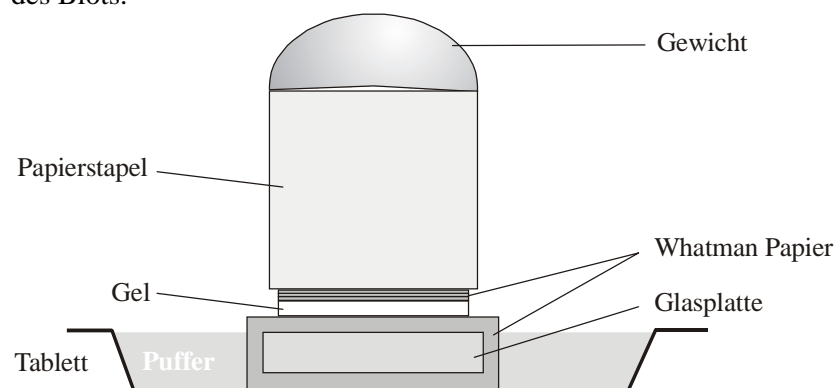


Abb. 5: Schematischer Aufbau des Northern Blots (Kapillarblot).

### Durchführung

#### Northern Blot

Vom Agarosegel wurden die Probenaschen mit einem Skalpell abgeschnitten und verworfen. Der Rest wurde in einer Plastikschale mit 20x SSC auf dem Schüttler 15 min äquilibriert.

In dieser Zeit wurden Papierhandtücher, drei Lagen Whatman Papier und eine Nitrocellulosemembran auf die Größe des Gels zurecht geschnitten. Zwei Lagen Whatman Papier wurden auf 20x35 cm geschnitten, angefeuchtet und nacheinander um eine Glasplatte gewickelt. Diese wurde dann auf ein mit 10x SSC befülltes Tablett gelegt. Auf die Nitrocellulose wurde eine Markierung angebracht, die

eindeutig die Seite, die dem Gel zugewandt werden sollte, sowie die Lage und Laufrichtung der Markerbande identifizierte. Die Membran wurde mit 10x SSC getränkt.

Das Gel wurde mit der Taschenöffnung nach unten auf die umwickelte Glasplatte gelegt, damit die glatte Seite zur Nitrocellulose zeigte. Darauf wurden die Membran und die drei in 10x SSC getränkten Lagen Whatman Papier gelegt. Zur Verstärkung des Kapillareffekts wurde ein ca. 10 cm hoher Stapel zurechtgeschnittener Papierhandtücher aufgelegt und mit einem Gewicht beschwert.

Der Transfer wurde über Nacht laufen gelassen.

Am nächsten Tag wurde die Nitrocellulose in 100 ml 4x SSC auf dem Schüttler kurz gewaschen und dann an der Luft getrocknet. Zur Fixierung der RNA wurde die Membran in Whatman Papier gelegt und eine Stunde im Ofen bei 80 °C gebacken.

### Färbung der Markerbande

Der Streifen der Membran, auf der sich der Marker befunden hat, wurde abgeschnitten und für die Färbung vorbereitet: Er wurde 15 min in 5%iger Essigsäure auf dem Schüttler bewegt und dann zehn Minuten in Methylenblau gefärbt. Nach der Färbung wurde der überschüssige Farbstoff mit VE-Wasser ausgewaschen. Der Filter wurde an der Luft getrocknet, und mit einem Kugelschreiber die Banden nachgezogen.

### Hybridisierung mit <sup>32</sup>P-markierter DNA-Sonde

Die Experimente mit radioaktiv markierten Proben durfte von uns nicht durchgeführt werden. Deshalb wurden diese Arbeiten von Stefanie durchgeführt.

Die Nitrocellulosemembran wurde in eine Folie eingeschweißt, wobei eine Seite zum Einfüllen der Lösungen offen blieb. Dort wurden 4.5 ml der Vorhybridisierungslösung eingefüllt, und die Öffnung dann zugeschweißt. Die Tüte wurde in eine Plastikschaale mit Wasser gelegt und dann zwei Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Der Beutel wurde danach an einer Ecke aufgeschnitten und die <sup>32</sup>P-markierte Probe (0.5 ml) hineinpipettiert. Der Beutel wurde wieder verschweißt und über Nacht bei 42 °C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurde der Beutel aufgeschnitten, die Hybridisierungslösung abgegossen und die Membran kurz mit wenig Waschlösung 1 abgespült. Danach wurde mit frischem Waschpuffer 1 15 min auf dem Schüttler gewaschen. Der Puffer wurde abgegossen und die Nitrocellulose anschließend zweimal für je 30 min in Waschpuffer 2 gewaschen.

### Autoradiographischer Nachweis

Die fertig präparierte Nitrocellulose wurde auf eine vorgefertigte Platte (mit Markierungen) in eine Filmkassette gelegt, mit Tesafilm festgeklebt und mit Frischhaltefolie nochmals fixiert. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm auf die (im Dunkeln leuchtenden) Markierungen und damit auf die Membran gelegt. Die Kassette wurde verschlossen und 3 Tage bei -70 °C aufbewahrt.

Der Röntgenfilm wurde nach langsamem Auftauen entwickelt.

### Ergebnisse und Auswertung

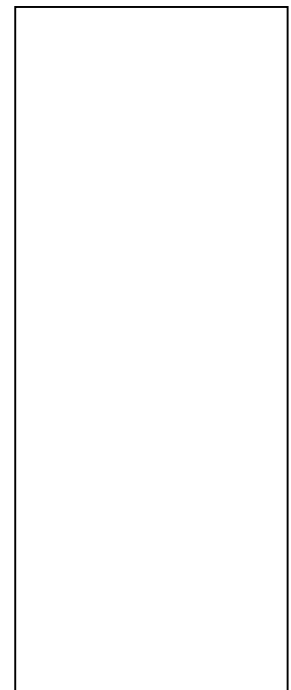
Wie in Abb. 6 zu sehen ist, zeigen die Auftragungen 1 (poly(A)<sup>+</sup>-Fraktion) und 3 (Gesamt-RNA) zwei intensive Banden, die sich vom Hintergrund abheben. Spur 2 (poly(A)<sup>-</sup>-Fraktion) weist einen deutlich geringeren Hintergrund auf. Es sind Banden an denselben Stellen zu erkennen, wenn auch weniger intensiv. Möglicherweise ist die Färbung auf Verschmierungen beim Blotten zurückzuführen, denn die Signale sind sehr schwach und nicht auf der ganzen Breite der Spur vorhanden.

Die beiden Banden der Spuren 1 und 3 lassen auf eine erfolgreiche Hybridisierung schließen, weshalb die Anreicherung der poly(A)<sup>+</sup>-Fraktion ebenfalls funktioniert hat.

## VIII *In situ* Nachweis von RNA in Geweben

### Einleitung

Bei der *in situ* Hybridisierung von RNA wird nicht nur die Anwesenheit von spezifischen RNA-Molekülen überprüft, sondern auch gleichzeitig ihre Lokalisation. Zudem ist eine Aussage über den Zeitpunkt der Expression möglich, was durch Proteinanalyse nicht unbedingt der Fall sein muss. Durch Markierung des Hybridisierungsansatzes ist ein empfindlicher Nachweis über die Färbung möglich.



**Abb. 6:** Kopie des vom Northern Blot belichteten Films.

## Durchführung

### Herstellen der RNA-Sonde

Für die spezifische RNA-Sonde wurde das T7-Transkriptionskit der Firma MBI verwendet. Es wurden zwei Proben des DOR67-Gens behandelt: der antisense- (AS) und der sense- (S) Strang.

Vom DNA-Template wurden jeweils 20 µl (was ~1 µg DNA entspricht) eingesetzt und die folgenden Reagenzien zugefügt: 10 µl 5x Transkriptionspuffer, 14 µl aqua bidest (mit DEPC), je 2 µl RNase-Inhibitor, DIG-RNA-Labeling Mix und T3- (für S) bzw. T7-Polymerase (für AS). Die Ansätze wurden zwei Stunden im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Zur Untersuchung der Transkription wurden je 2 µl der Proben mit 2 µl Beladungspuffer und 8 µl RNasefreiem H<sub>2</sub>O versetzt und auf eine 1%iges Agarosegel aufgetragen (Laufdauer eine halbe Stunde bei 100 V). Der Rest wurde alkalisch verdaut: Zu dem Ansatz wurden 30 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und 20 µl NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegeben und 38 min bei 60° C inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe der Abstopplösung (5 µl 10%ige Essigsäure, 11µl 3 M NaOAc pH 6.0, 1 µl tRNA-Stocklösung (25 mg/ml), 1.2 µl 1 M MgCl<sub>2</sub>). Anschließend wurden 2 µl RNasefreie DNaseLösung zugefügt, 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und dann je 1 µl auf ein Probegel wie oben aufgetragen. Der Rest wurde in 150 µl EtOH abs. bei -70 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Spur	Gel 1			Gel 2			
	1	2	3	1	2	3	4
Probe	Marker	AS	S	Marker	AS	S	

**Tabelle 2:** Auftragungen auf die Agarosegele; Gel 1: ohne DNase, Gel 2: mit DNase.

### Dot Blot

Eine weitere Kontrolle auf Erfolg Transkription wurde mit dieser Methode durchgeführt; zudem ist es möglich, eine maximale Verdünnung zu bestimmen, bis zu welcher die Färbung och sichtbar ist. Dazu wurden von beiden Ansätzen je eine 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnung angesetzt. Je 1 µl dieser Verdünnungen wurde auf ein mit folgendem Schema beschriftetes Stückchen Nitrocellulose punktförmig aufgetragen:

Probe	1:10	1:100	1:1000
Probe 1 (S)			
Probe 2 (AS)			

Die Nitrocellulose wurde eine halbe Stunde im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet und dann zweimal für je fünf Minuten mit TBST (0.2% Tween 20) auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurde eine Stunde mit 10 ml einer 1:5000 Verdünnung des Anti-DIG-Antikörpers (gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, AP) bei RT inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper wurden durch zweimaliges kurzes Waschen mit TBST entfernt.

Die Färbung erfolgte mit NBT und BCIP als Substrate für die AP: 15 min Inkubation bei RT mit 16.5 µl BCIP und 33 µl NBT in 5 ml AP-Puffer. Gestoppt wurde die Reaktion durch Waschen mit TBST und Lufttrocknen der Membran.

### Herstellen der Gewebeschnitte

Die Fliegen wurden auf einer Platte mit CO<sub>2</sub> betäubt. Unter dem Mikroskop wurde vorsichtig mit einem Skalpell der Kopf abgetrennt. Er wurde in Einbettmedium gesetzt, das auf eine Stempel getropft worden war. Der Kopf ist dabei so auszurichten, dass beide Augen in einer Ebene parallel zum Stempel liegen und der Rüssel nach vorne zeigt. Das Medium wird durch vorsichtiges Eintauchen des Stempels in flüssigen Stickstoff erhärtet; anschließend wird der Stempel in den Kryostaten eingespannt.

Mit dem voreingestellten Programm wurden Gefrierschnitte von 10 µm Dicke hergestellt und auf einem Objektträger aufgenommen. Diese wurden bei -20 °C im Kryostaten über Nacht aufbewahrt. Die am ersten Tag hergestellten Schnitte wurden verworfen; es wurden die am folgenden Tag angefertigten benutzt.

### Hybridisierung

Das Wasserbad wurde auf 58 °C vorgewärmt und die Hybridisierungslösung darin temperiert. Die Schnitte wurden aus dem Kryostaten genommen und an der Luft 20 min bei RT trocknen gelassen.

Währenddessen wurde die 4% PP-Lösung angesetzt: 22.5 ml RNasefreies Wasser wurde auf 60 °C erhitzt und vorsichtig 1 g Paraformaldehyd (staubt und ist giftig!!) zugegeben. Es wurden 2.5 µl

10 M NaOH zupipettiert und nach dem Aufklaren 2.5 ml 10x PBS. Nach Sterilfiltration durch einen 2 µm Filter wurde die Lösung auf Eis gestellt.

Die Objektträger wurden mit ca. 2 ml der 4% PP-Lösung beträufelt und dann 10 min zur Fixierung stehen gelassen. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für 3 min mit 1x PBS in Waschkammern gestellt und gewaschen.

Für die Acetylierung wurden 250 ml TEA in eine Waschkammer mit Rührfisch gegeben und die Objektträger hineingestellt. Der Rührer wurde auf kleine Stufe gestellt und langsam 0.625 ml Essigsäureanhydrid (ESA) zugetropft. Nach der Verteilung wurde der Rührer ausgestellt und 10 min inkubiert. Dann wurden die Schnitte dreimal für je 5 min in 1x PBS gewaschen und anschließend eine Stunde bei 58 °C im Hybridisierungspuffer vorhybridisiert.

Währenddessen wurden die RNA-Proben aus dem Freezer genommen, aufgetaut (bei RT) und 30 min bei 4 °C und 14,000 rpm in der Eppifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen, das Pellet mit 100 µl 70% Ethanol versetzt und fünf min wie zuvor zentrifugiert. Nachdem das Ethanol abgenommen worden war, löste man die RNA in 50 µl H<sub>2</sub>O und gab 50 µl Hybridisierungspuffer zu.

Die folgenden Proben wurden für die Hybridisierung verwendet:

Probe	1	2	3	4
Gen	NorpA	NorpA	DOR67	DOR67
sense	AS	S	AS	S
Restriktions- enzym	<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	<i>Eco</i> RI	<i>Xho</i> I
Schnitte von	Simone	Akif	Sven	Steffi

Von jeder Probe wurden 2.5 µl mit 200 µl Hybridisierungspuffer versetzt und im Wasserbad für 5 min auf 80 °C erhitzt. Die Proben wurden danach auf Eis gekühlt und komplett auf die Objektträger mit den Schnitten (wie oben angegeben) pipettiert. Ein Deckgläschen wurde aufgelegt und mit Fixogum<sup>®</sup> verklebt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 58 °C in einer feuchten Kammer im Brutschrank. In einem Wasserbad wurden drei Waschkammern mit 2.0x SSC und eine mit 5x SSC vorgewärmt (ebenfalls über Nacht).

### Detektion

Am nächsten Tag wurden die Objektträger in die mit 5x SSC gefüllte Waschkammer gestellt und das Deckgläschen entfernt. Es folgten drei Waschungen von 20 min in den Waschkammern mit 0.2x SSC (58 °C) und zwei mit 1x PBST bei RT. Dann wurde eine Stunde mit der B2-Lösung geblockt.

Für die Detektion wurde von der Anti-DIG/AP-Lösung 4 ml einer 1:1000 Verdünnung in B2 hergestellt. Davon wurde je 1 ml auf jeden Objektträger pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die überschüssigen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für 30 min in 1x PBST entfernt. Anschließend wurde 20 min in B3 äquilibriert.

Für die Färbung der Schnitte wurde die Färbelösung frisch angesetzt: 150 ml B3, 1.5 ml 100 mM Levamisol, 0.15 ml Tween20, 0.675 ml NBT-Stammlösung und 0.525 ml BCIP-Stammlösung.

Diese wurde in eine mit Alufolie umhüllte Waschkammer gegossen und die Objektträger hineingestellt. Nach einer Viertelstunde wurde das erste Mal die Färbung angeschaut; insgesamt dauerte die Färbereaktion aber eine Stunde, da die Intensität der Färbung sehr gering war. Dann wurden die Schnitte kurz in aqua bidest getaucht und mit erwärmtem Einbettungsmedium beschichtet. Ein Deckgläschen wurde aufgelegt und die Schnitte getrocknet.

### Ergebnisse und Auswertung

#### Dot Blot

Der Blot (Abb. 7) zeigt bei beiden Ansätzen durch die Färbung, dass der Einbau von DIG-markierten Nukleotiden erfolgreich verlaufen ist. Obwohl beim Original-Blot noch die 1:100 Verdünnungen eine leichte Färbung zeigten, wäre es zu unsicher, diese einzusetzen. Die Intensität der 1:10 Verdünnung hingegen ist ausreichend, die Probe als gut zu beurteilen.

#### Gele

Wie aus den Photos in Abb. 8 zu entnehmen ist, konnte die DNA



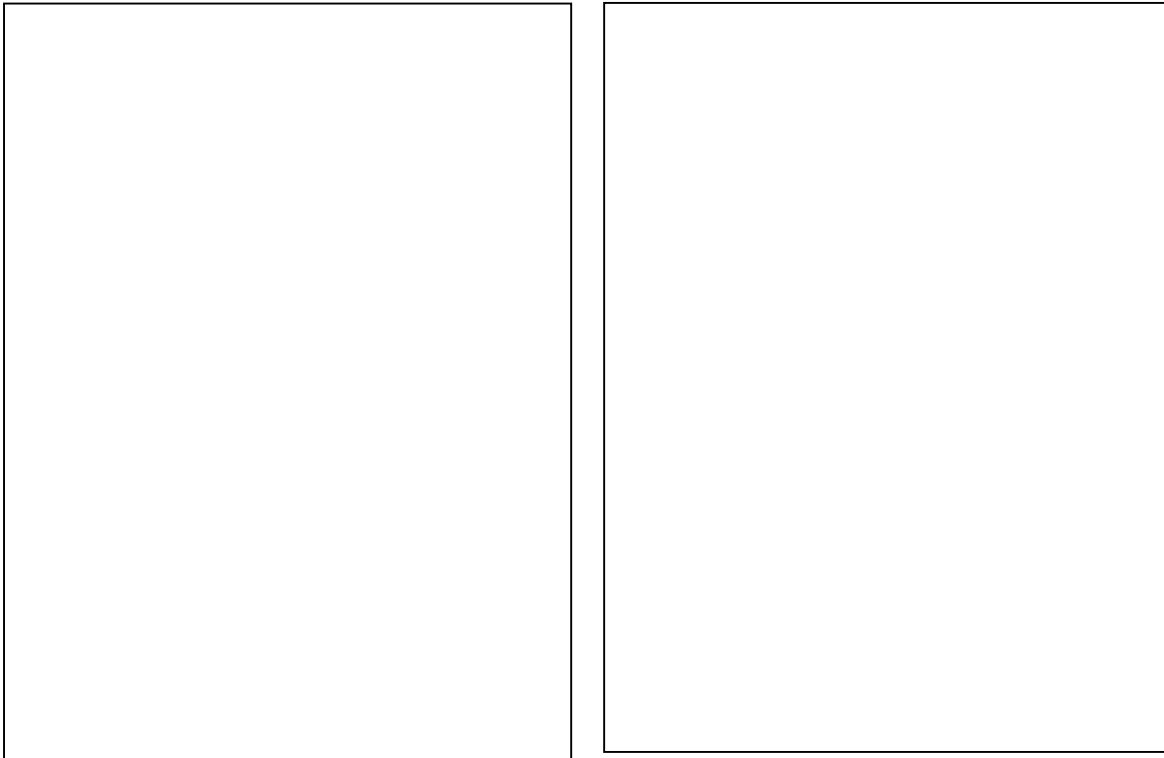
**Abb. 7:** Kopie des Dot Blots. Auf dem Original sind noch leichte Färbungen bei den 1:100 Verdünnungen zu erkennen.

durch den DNase-Verdau aus den Proben entfernt werden (rechts). Die dünnen Banden sind nur auf dem Gel zu erkennen, das mit Proben vor dem Verdau angesetzt worden war (links).

### Gewebeschnitte

Die Photos der angefärbten Schnitte sind als Anhang angefügt.

Den Erwartungen entsprechend ist eine Färbung nur bei den eingesetzten Proben mit antisense-Strang zu erkennen. Die Färbung bedeutet einen positiven Nachweis der mRNA der entsprechenden Gene. Diese Stellen sind in den Grafiken mit weißen Kreisen bzw. Pfeilen markiert. Das Gen DOR67 wird nur in den Antennen exprimiert, das NorpA-Gen in den Augen.



**Abb. 8:** (links) Aufnahme des Agarosegels mit den Proben, die nicht mit DNase behandelt wurden.(rechts) Agarosegel mit DNase-behandelten Proben. Die linken Spuren der rechten Aufnahme sind dieselben Auftragungen wie rechts, die allerdings durch erneutes Benutzen des Gels weiter gelaufen sind.

## IX Alternative Methoden

Die folgenden Abwandlungen bzw. Alternativen zu den in unserem Praktikum durchgeführten Methoden sind den „Current Protocols in Molecular Biology“ entnommen. Hier werden allerdings nur die wichtigsten Unterschiede aufgezählt.

### Denaturierung von RNA mit Glyoxal/DMSO und Northern-Hybridisierung

Eine Analyse mit dieser Denaturierungsmethode liefert zwar schärfere Banden, ist aber schwieriger in der Durchführung. Viele Schritte sind gleich und werden hier nicht aufgeführt.

Der eingesetzte Puffer ist ein Natrium-Phosphat Puffer. Im Probenpuffer befinden sich DMSO und Glyoxal zur Denaturierung anstatt Formaldehyd. Durch den Einsatz von Glyoxal ist es notwendig, den Laufpuffer während der Elektrophorese zu bewegen. Dies kann entweder durch einen entsprechenden Apparat oder durch mehrfaches Schwenken der Kammer erfolgen. Es entsteht ansonsten ein pH-Gradient, der eine Dissoziation des Glyoxals und damit eine Renaturierung der RNA bewirken kann.

Nach dem Transfer auf eine Nylon- oder Nitrocellulosemembran wird unmittelbar vor der Hybridisierung das Glyoxal durch Waschen mit 20 mM Tris·Cl entfernt.

### **Northern-Hybridisierung von unfraktionierter RNA mit der Slot Blot-Technik**

Die beiden eben genannten Methoden legen eine Fraktionierung der RNA zugrunde. Diese Technik ermöglicht die Immobilisierung von nichtfraktionierter RNA auf Membranen und anschließende Bestimmung des relativen Gehalts.

Obwohl es sich bei dieser Methode um eine recht einfach durchzuführende handelt, sind mehrere Bedingungen zu erfüllen und Fehlerquellen zu beachten (mehr dazu nach der Durchführung). Da sie sich doch recht stark von den bisher erwähnten beiden Techniken unterscheidet, soll hier die grundsätzliche Durchführung beschrieben werden.

#### **Durchführung**

Es ist ratsam, fertige Apparaturen einzusetzen, da diese eher reproduzierbare Ergebnisse liefern. Eine solche Apparatur heißt manifold. Diese wird zu Beginn mit NaOH gereinigt und mit Wasser gespült. Eine Membran wird zurechtgeschnitten, in 10x oder 20x SSC getränkt und in die manifold gelegt. Dann wird die Apparatur zusammengebaut und die Slots mit 10x SSC (ohne Luftblasen) befüllt.

Die RNAs werden in einer Denaturierungslösungen entweder mit Formamid und Formaldehyd oder Glyoxal/DMSO denaturiert. Die Pumpe der manifold wird eingeschaltet und das eingefüllte SSC durchgesaugt. Vorsichtig werden die Slots mit den Proben befüllt und 10x SSC zugegeben. Diese werden ebenfalls durchgesaugt und der Vorgang wiederholt. Anschließend wird die Membran entnommen und auf Whatman Papier getrocknet. Hybridisierung und Detektion erfolgen wie bei den anderen Methoden.

#### **Besonderheiten, Gefahren**

Durch die parallele Auftragung verschiedener Proben ist ein Vergleich des relativen Gehalts an gesuchter RNA möglich. Dafür muss jedoch in allen Slots die gleiche Menge an RNA vorliegen. Das ist schwierig, da die Bestimmung durch Messung der Extinktion durch Proteine und DNA leicht gestört wird. Selbst wenn diese Bedingung erfüllt ist, kann noch keine Aussage über die tatsächliche Expressionsrate getroffen werden. Der Grund dafür ist, dass nicht immer zur gleichen Zeit exprimiert wird und aktive Gene falsch eingeordnet werden.