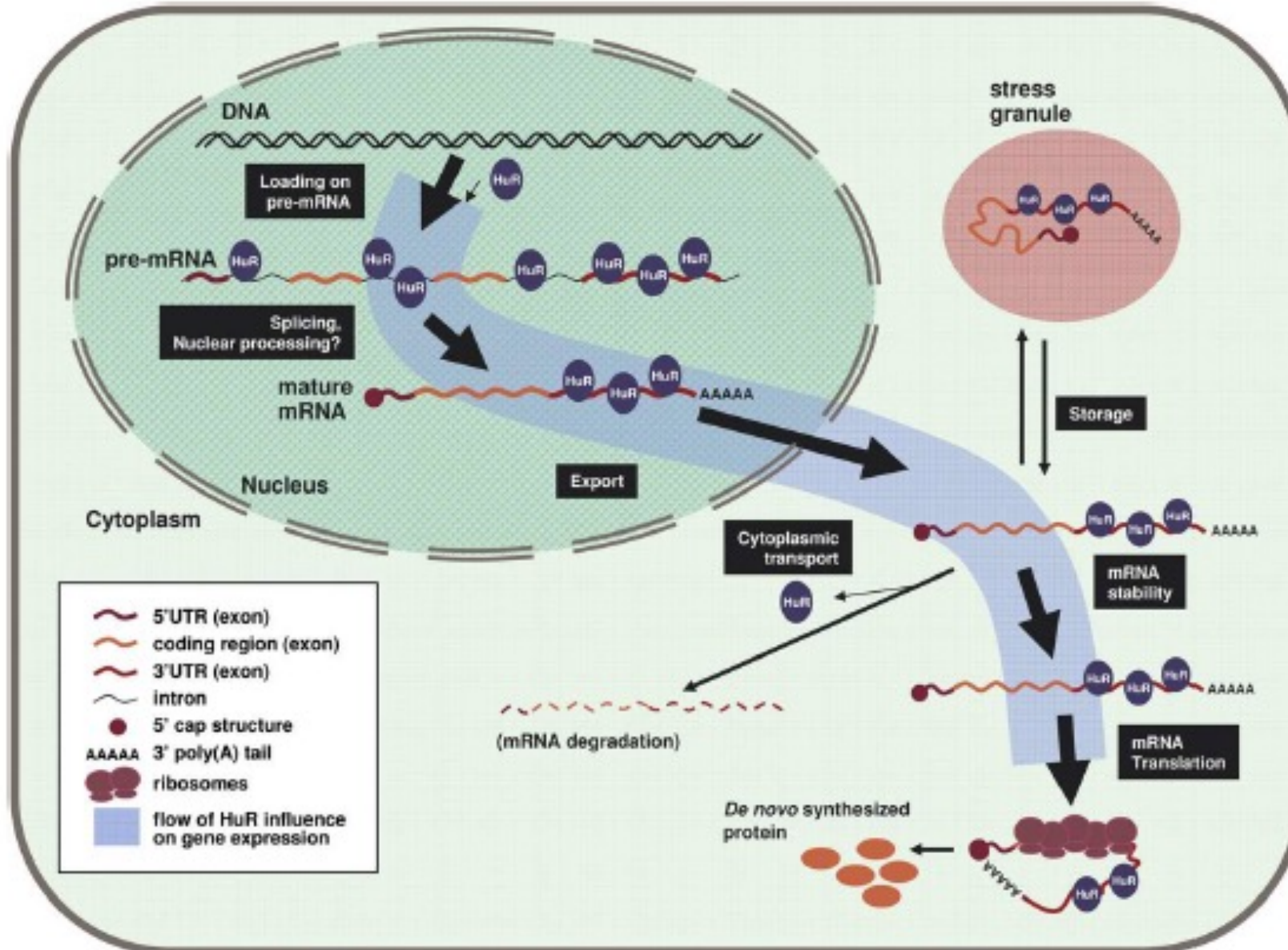
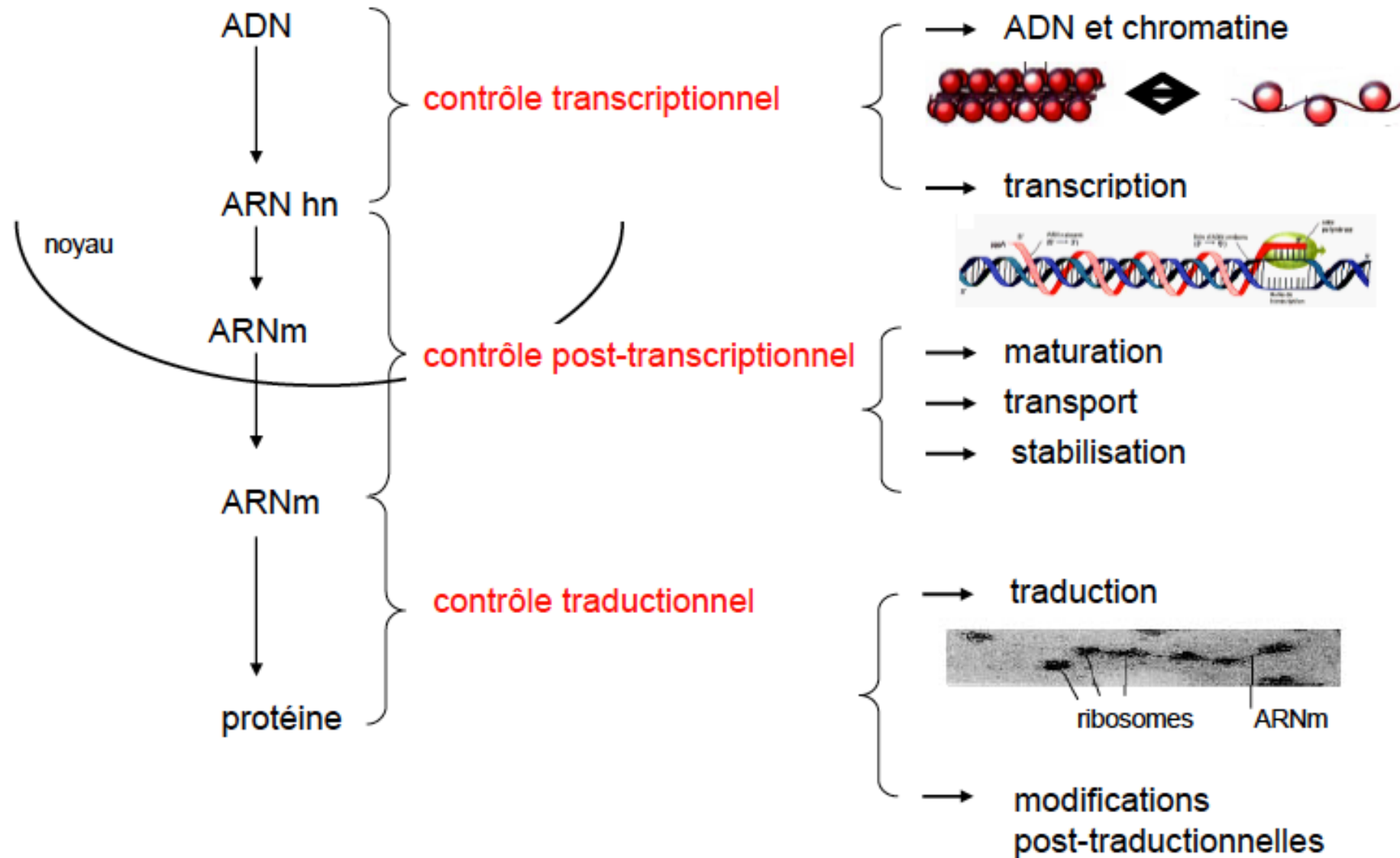


Protocol - RNA-protein interaction

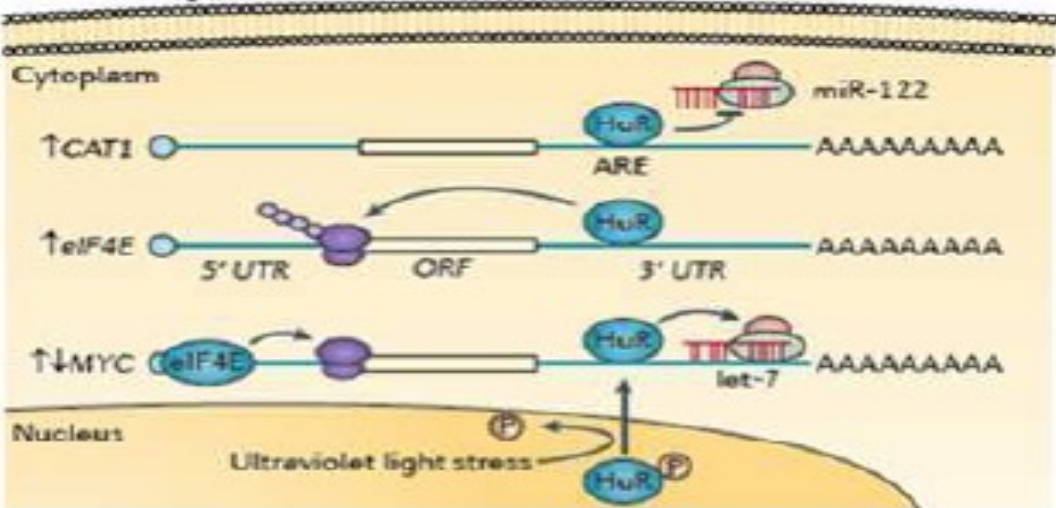
RNA binding assay REMSA (RNA electrophoresis shift assay)



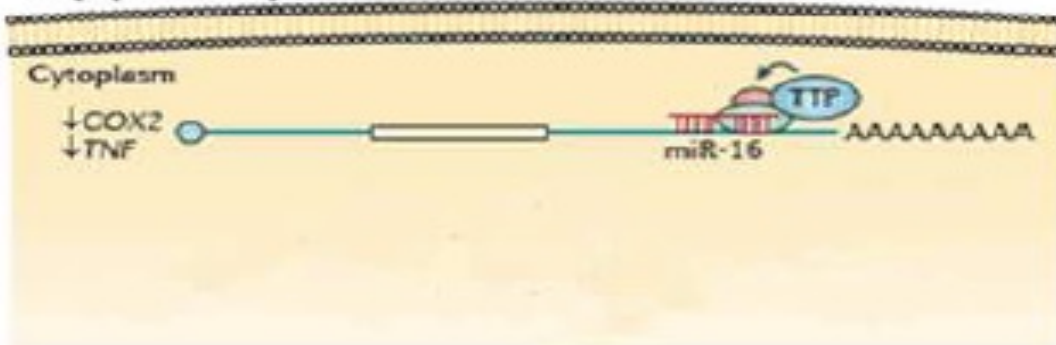
Niveaux de régulation de l'expression



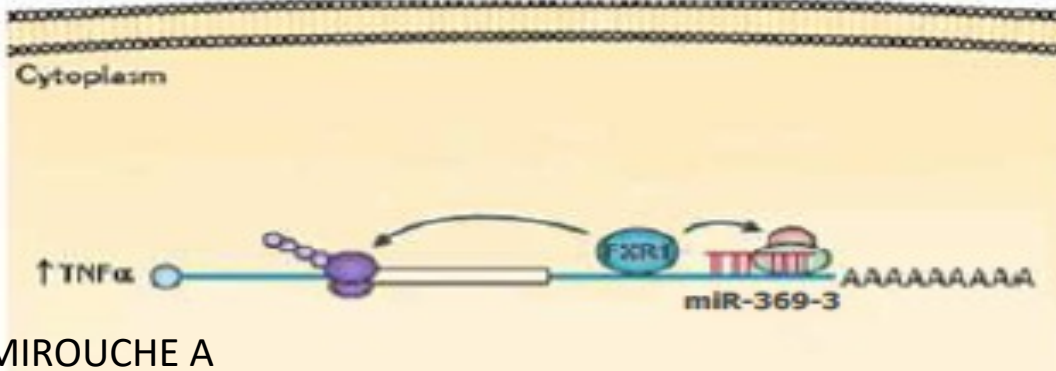
a Stress response



b Apoptosis and proliferation

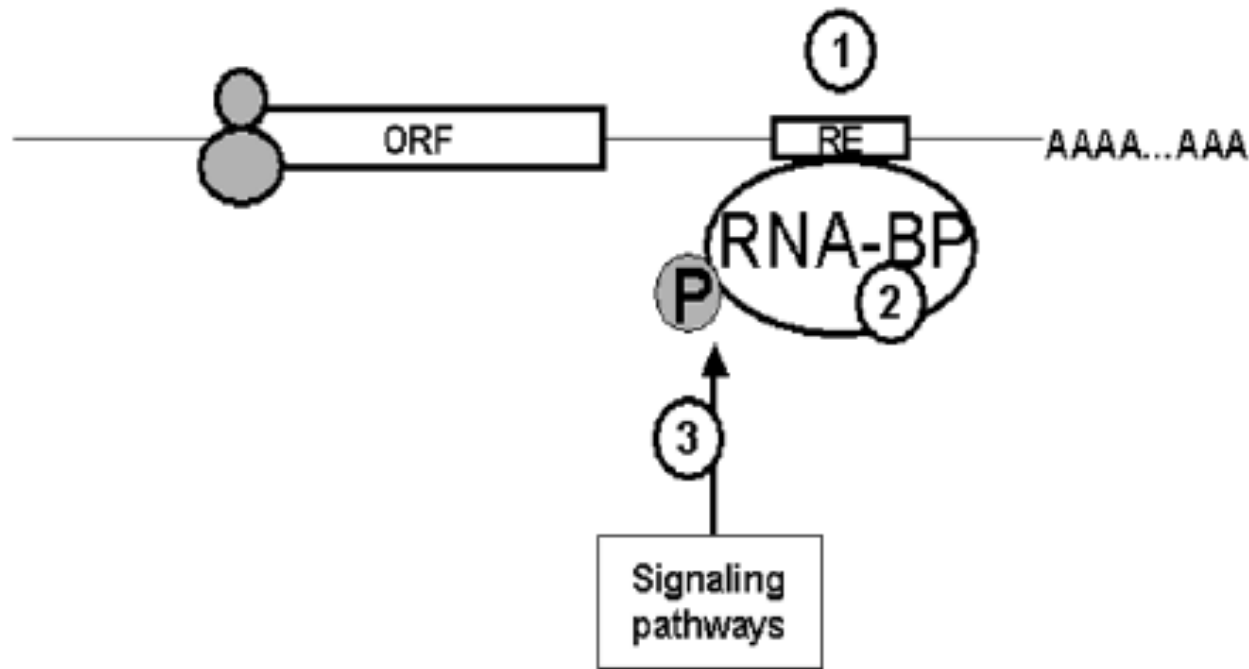


c Serum starvation



Show entries

Chromosome	Start	End	Motif	Motif-family	Str
chr4	74097041	74097054	AAATATTTAAAAA	WWWWTTTWWWWW	
chr4	74097042	74097053	AAATATTTAAAA	WWWWTTTWWWWW	
chr4	74097043	74097052	ATATTTAAA	WWWWTTTWWW	
chr4	74097044	74097051	TATTTAA	WWTTTWW	
chr4	74097045	74097050	ATTTA	ATTTA	
chr4	74097052	74097058	AATAAA	AATAAA	
chr4	74097081	74097090	ATATTTATT	WWWWTTTWWW	
chr4	74097082	74097089	TATTTAT	WWTTTWW	
chr4	74097083	74097088	ATTTA	ATTTA	
chr4	74097169	74097176	ATTTTAT	WWTTTWW	



- ① Alteration of regulatory elements by point mutations or deletions
- ② Alteration of the RNA Binding Protein
 - Mutations leading to a change in the affinity of the RNA-BP for its target
 - Titration of RNA-BP by overexpression of a target sequence
 - Over or underexpression of the RNA-BP
- ③ Alteration of signalling pathways
 - Change in the binding specificity of the RNA-BP via post-translational modifications
 - Change in the cofactors (or protein partners) interacting with the RNA-BP

ARE^{SITE}_{SITE}

Database for AU-rich elements and direct evidence for Interaction and lifetime regulation

[Home](#)

[Help](#)

[Statistics](#)

[Bulk Download](#)

[Genes with motif](#)

**Link
section**

**AREsite
versions**

AREsite1

**External
databases**

ARED

GRED

AURA

CLIPdb

Welcome to the new AREsite Whats new

More genomes, more motifs, more information

AREsite2 was published in the NAR database issue 2016: [DOI:10.1093/nar/gkv1238](https://doi.org/10.1093/nar/gkv1238)

If you find this resource helpful, you might want to cite us, just download the citation [here](#)

If you have suggestions or ideas to improve this website, please, feel free to contact us at ma@tbi.univie.ac.at

You can now query for a list of genes containing your motif of interest in the genes section

**If you are new here, check out the help section.
For an example query click the button below.**

Example Query

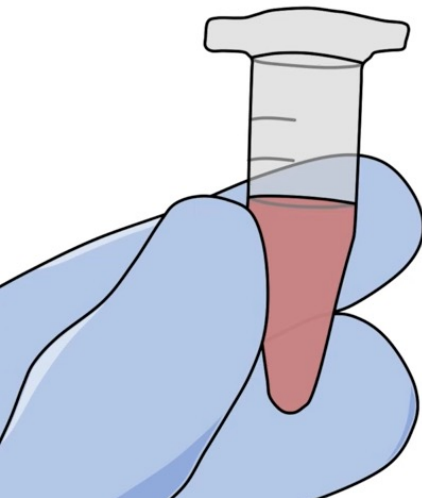
Select motifs of interest

ATTTA WTTTW WWTTTWW
 WWWTTTWWW WWWWTTTTWWWWW WWWWWWTTTWWWWW
 TTTGTTT GTTTG AWTAAA

I- Transcription In Vitro

in vitro Transcription

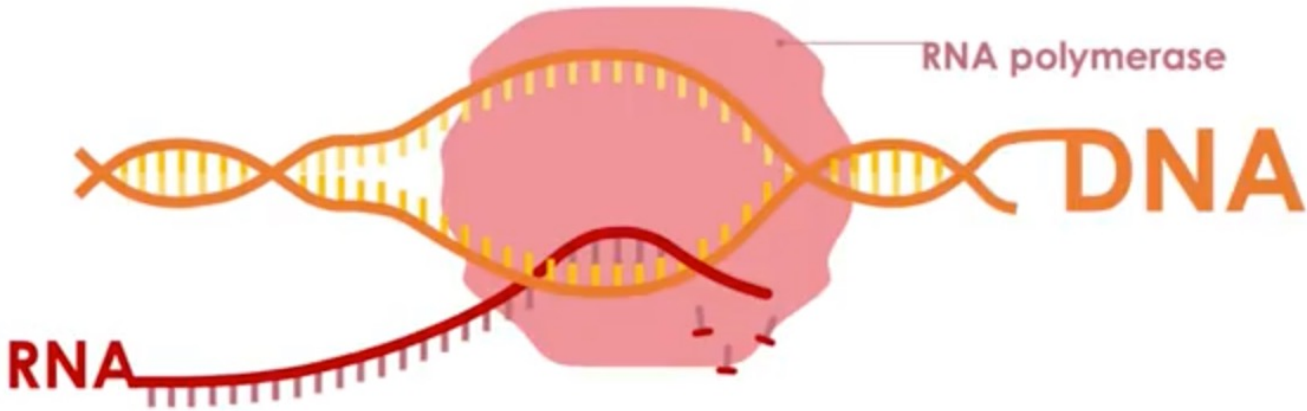
Synthetic transcription in a reaction tube



>>*in vitro* Transcription<<

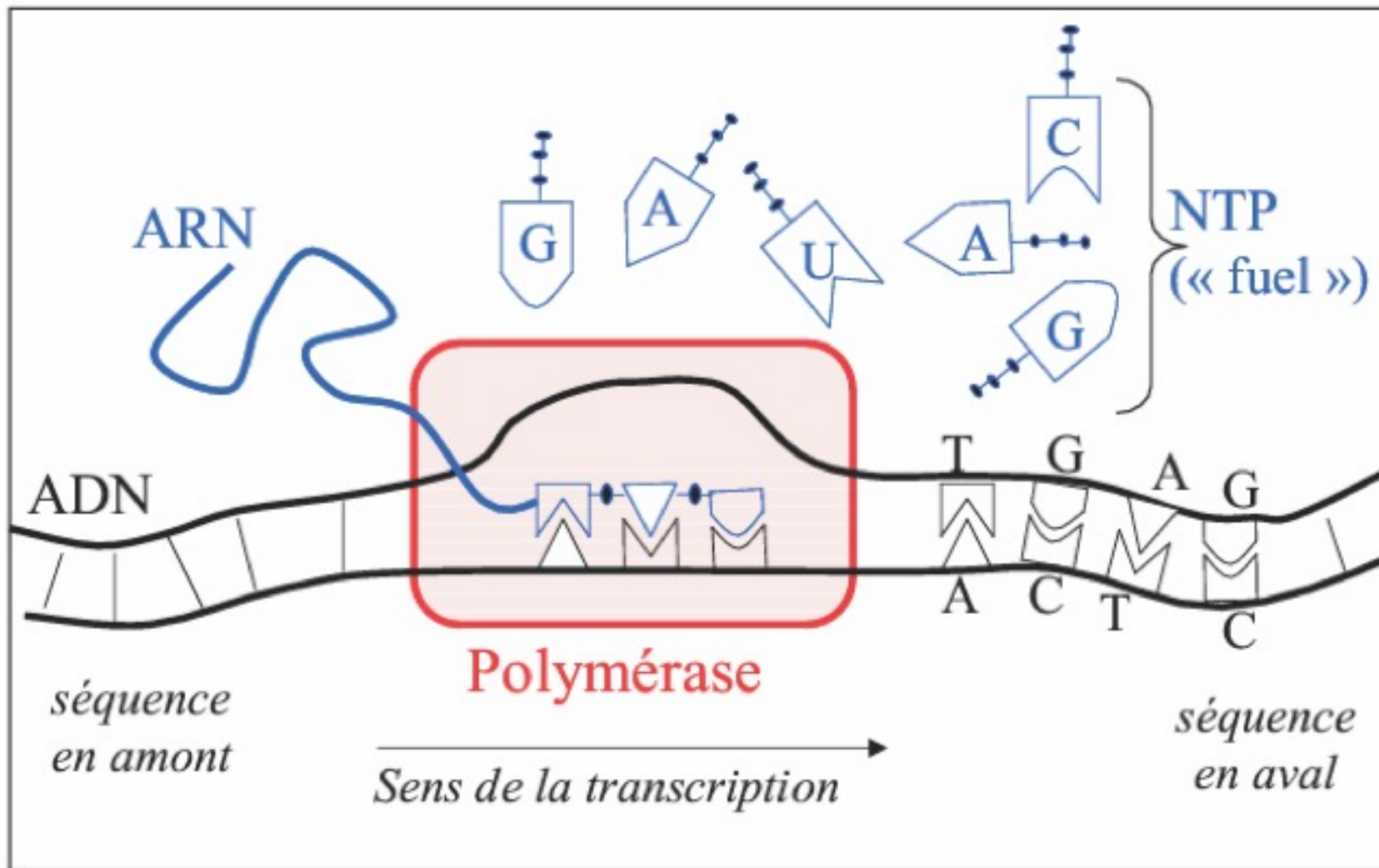
Transcription

Biological process in cells



Protocol
in vitro transcription

~~~~~  
~~~~~  
~~~~~  
~~~~~  
~~~~~



Schématisation du processus de transcription. La polymérase avance sur l'ADN à la manière d'un train sur des rails. A chaque pas, la polymérase incorpore un nucléotide provenant de la solution dans la chaîne d'ARN qu'elle synthétise. Pour cela, elle ouvre partiellement la double hélice d'ADN (formation de la bulle de transcription); l'ordre d'incorporation est basé sur l'appariement des paires de bases : les nucléotides incorporés sont complémentaires du brin d'ADN copié (brin du bas sur le schéma).



# *in vitro* Transcription

Step 1: DNA template generation



linear DNA fragment

T7 RNA Polymerase



# *in vitro* Transcription

Step 1: DNA template generation



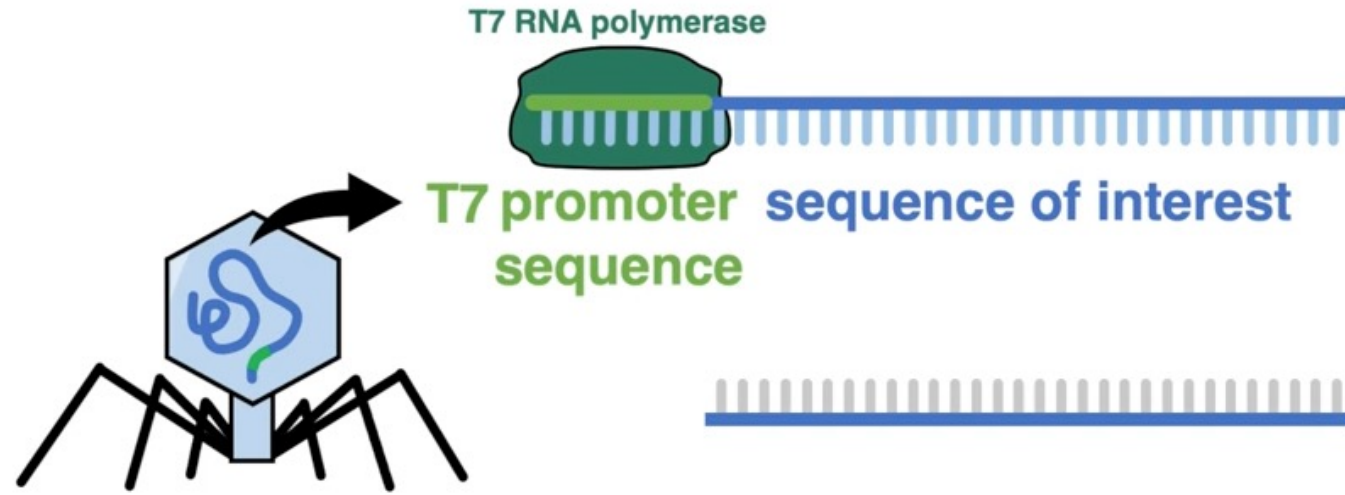
promoter sequence  
sequence of interest



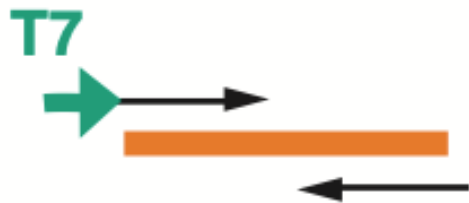
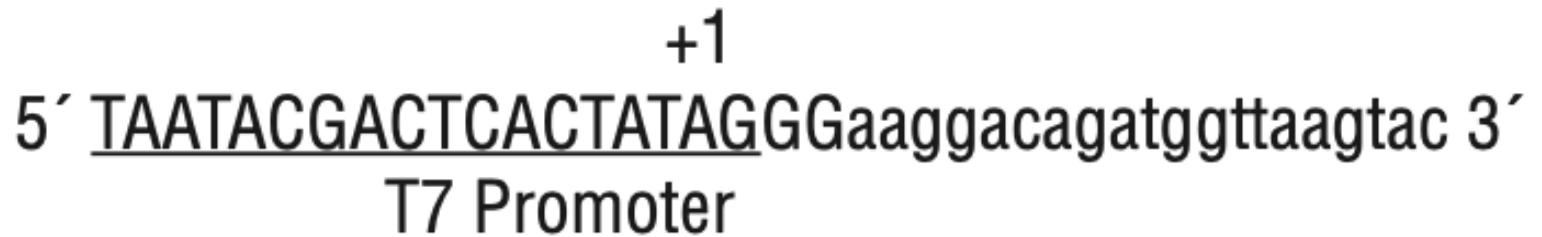
# *in vitro* Transcription

## Step 1: DNA template generation

T7 RNA Polymerase



Introduction of  
T7 sequence in  
one strand



PCR

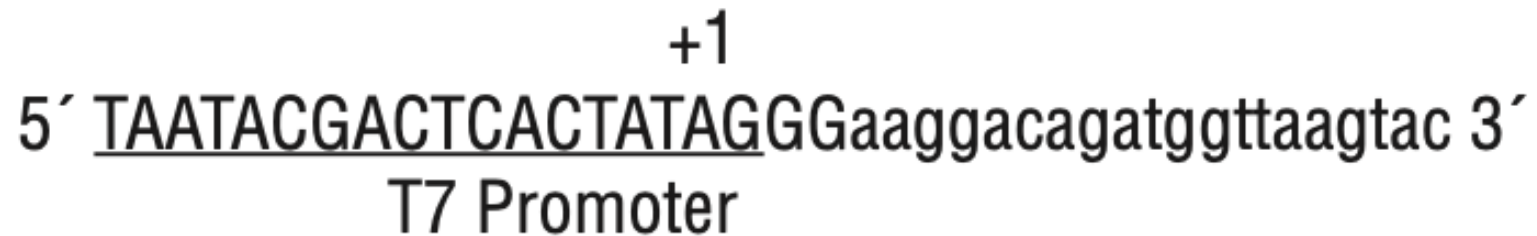


→ **ssRNA**  
*in vitro*  
transcription

## L'initiation

L'initiation consiste tout d'abord en la reconnaissance par la polymérase d'une séquence promoteur sur l'ADN à transcrire. La séquence dite consensuelle du promoteur de l'ARNPT7 contient 23 bases, notées de -17 à +6, +1 correspondant à la première base transcrite :

**On peut diviser cette séquence en trois parties.**



**La première partie de -17 à -6** constitue la séquence de reconnaissance spécifique.

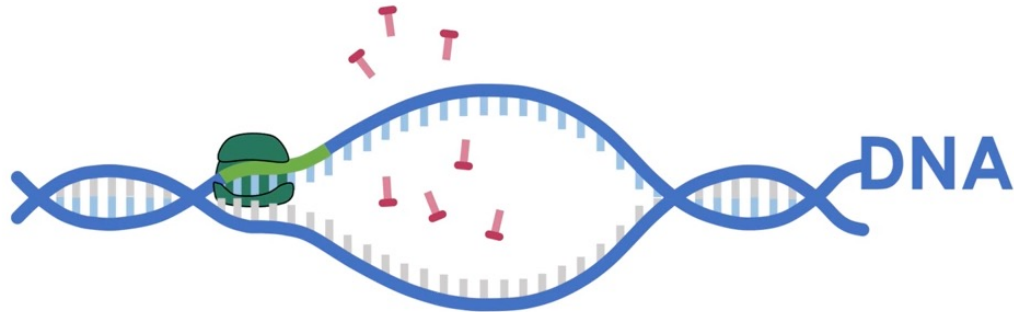
**La seconde partie, de -4 à -1** est composée de la séquence TATA, importante pour la séparation des deux brins d'ADN au niveau du promoteur, et commune à de nombreuses séquences promoteur d'autres polymérases : la liaison polymérase-promoteur entraîne une courbure de l'ADN pouvant favoriser l'ouverture de la double hélice au niveau de la séquence TATA.

**La troisième partie, de +1 à +6**, rassemble les premières bases transcrites par la polymérase.

# *in vitro* Transcription

Step 2: *in vitro* transcription reaction

DNA + T7 RNA polymerase + nucleotides

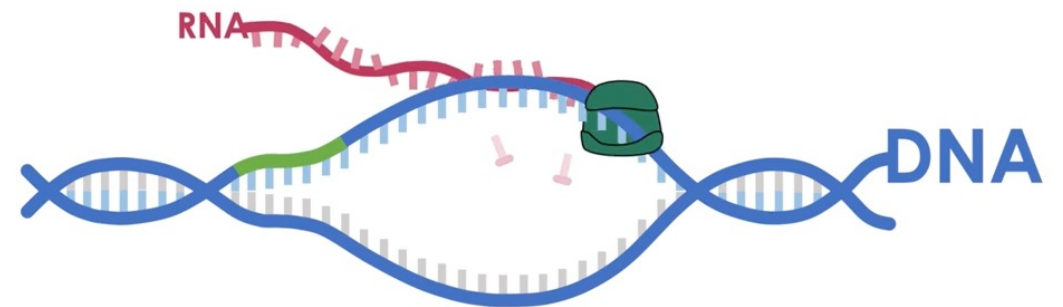


|                                        |                  |
|----------------------------------------|------------------|
| RNase-Free Water                       | X $\mu$ l        |
| 10X Transcription Buffer               | 4 $\mu$ l        |
| 20X Ribonucleotide Solution Mix        | 2 $\mu$ l        |
| Template(s) (1–2 $\mu$ g)              | X $\mu$ l        |
| 20X HMW Mix                            | 2 $\mu$ l        |
| T7 RNA Polymerase (500 units/ $\mu$ l) | 2 $\mu$ l        |
| Total reaction volume                  | <hr/> 40 $\mu$ l |

# *in vitro* Transcription

Step 2: *in vitro* transcription reaction

DNA + T7 RNA polymerase + nucleotides



**Incubate at 42°C for at least 3 – 4 hrs. Overnight incubations will result in higher yields.**

10X Transcription Buffer, 200  $\mu$ l

400 mM Tris-HCl (pH 8.0)

190 mM  $MgCl_2$

50 mM DTT

10 mM spermidine

20X Ribonucleotide Solution Mix (rNTPs), 100  $\mu$ l

20 mM Tris-HCl (pH 7.8)

10 mM DTT

80 mM each NTP

20X High Molecular Weight (HMW) Mix, 100  $\mu$ l

20 mM Tris-HCl (pH 8.0)

83 units/ml inorganic pyrophosphatase (yeast)

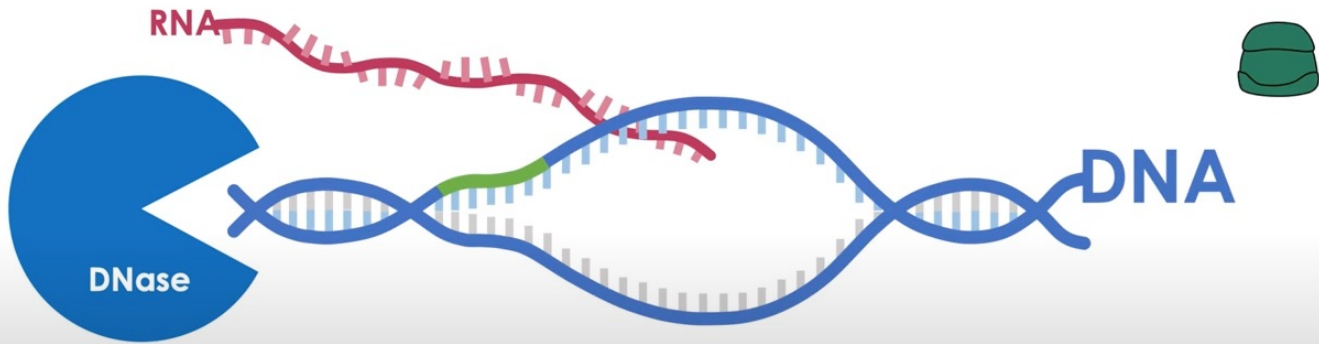
20,000 units/ml murine ribonuclease inhibitor

40% glycerol

# *in vitro* Transcription

## Step 3: Purification

DNA + T7 RNA polymerase + nucleotides



Pause (k) DNase + incubation for 15 min to degrade DNA template

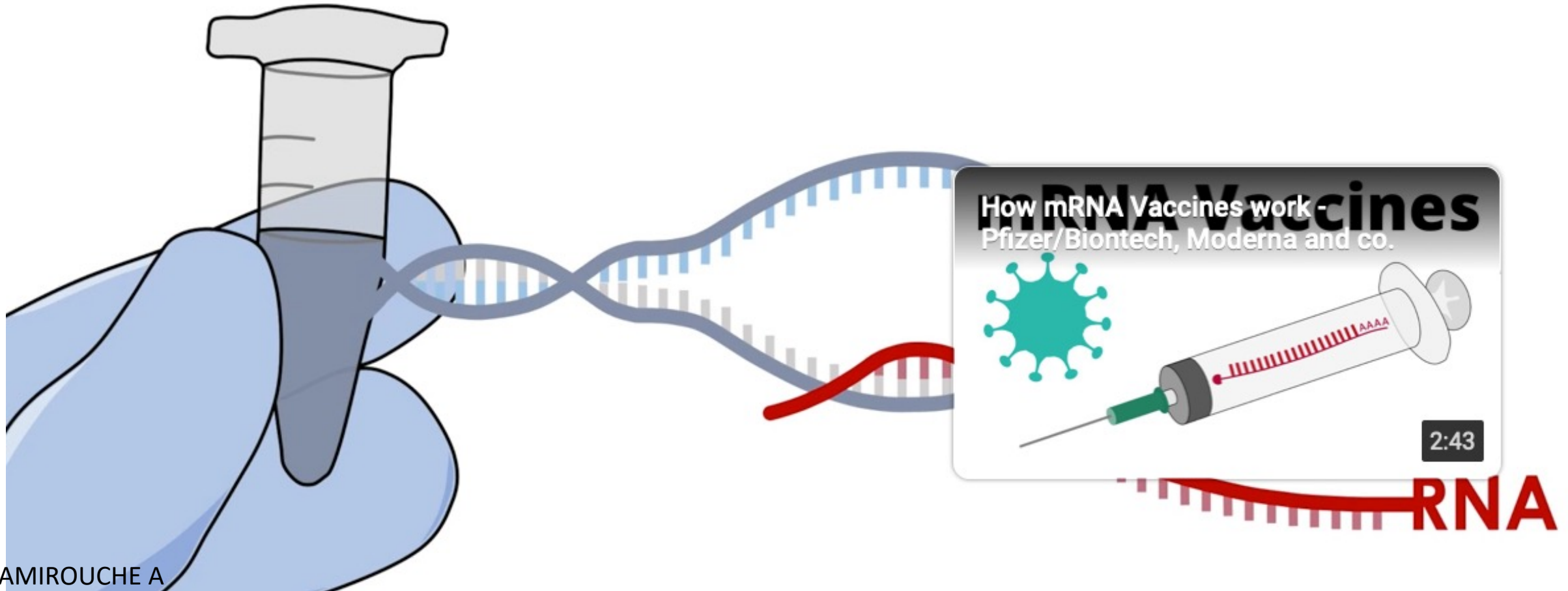
# *in vitro* Transcription

## Step 3: Purification



# *in vitro* Transcription

A powerful technique to obtain desired RNA



# RNA Quantitation:

UV Absorbance: 1  $A_{260}$  unit = 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA

Note: Nucleotide removal by G25 spin column is essential for accurate quantitation.

## References:

1. Schenborn, E.T. and Mierendorf, R.C. (1985) *Nucl. Acids Res.*, 13, 6223–6236.
2. Milligan, J.F. et al. (1987) *Nucl. Acids Res.*, 15, 8783–8798.
3. Sampson, J.R. and Uhlenbeck, O.C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1033–1037.



# I- Protéine recombinante

Les protéines recombinantes sont des protéines étrangères produites dans des hôtes d'expression. Ces protéines recombinantes sont utilisées comme réactifs de diagnostic médical dans le domaine de la santé humaine, tels que les vaccins, les médicaments ou les anticorps, ainsi que dans les analyses biochimiques.

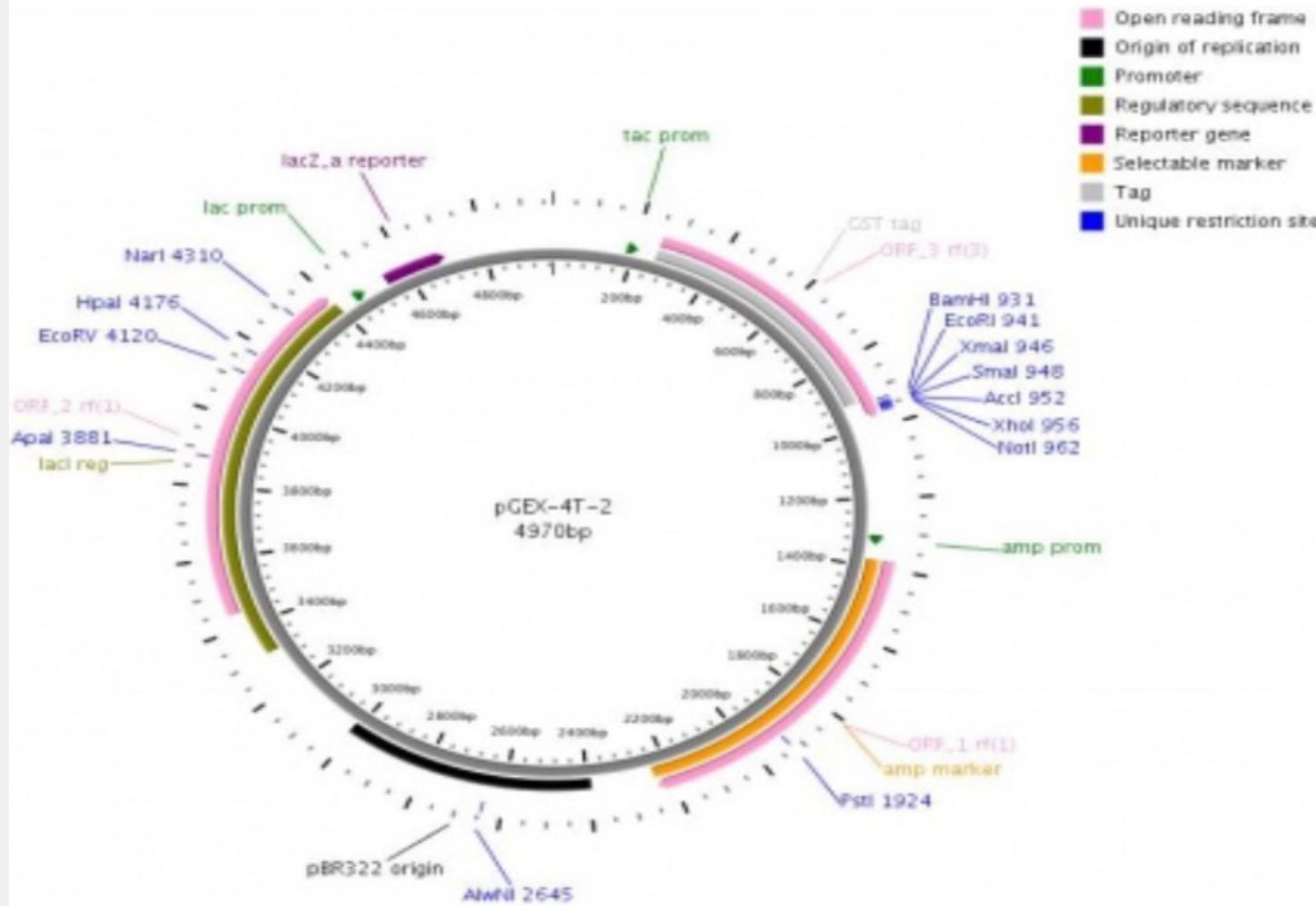
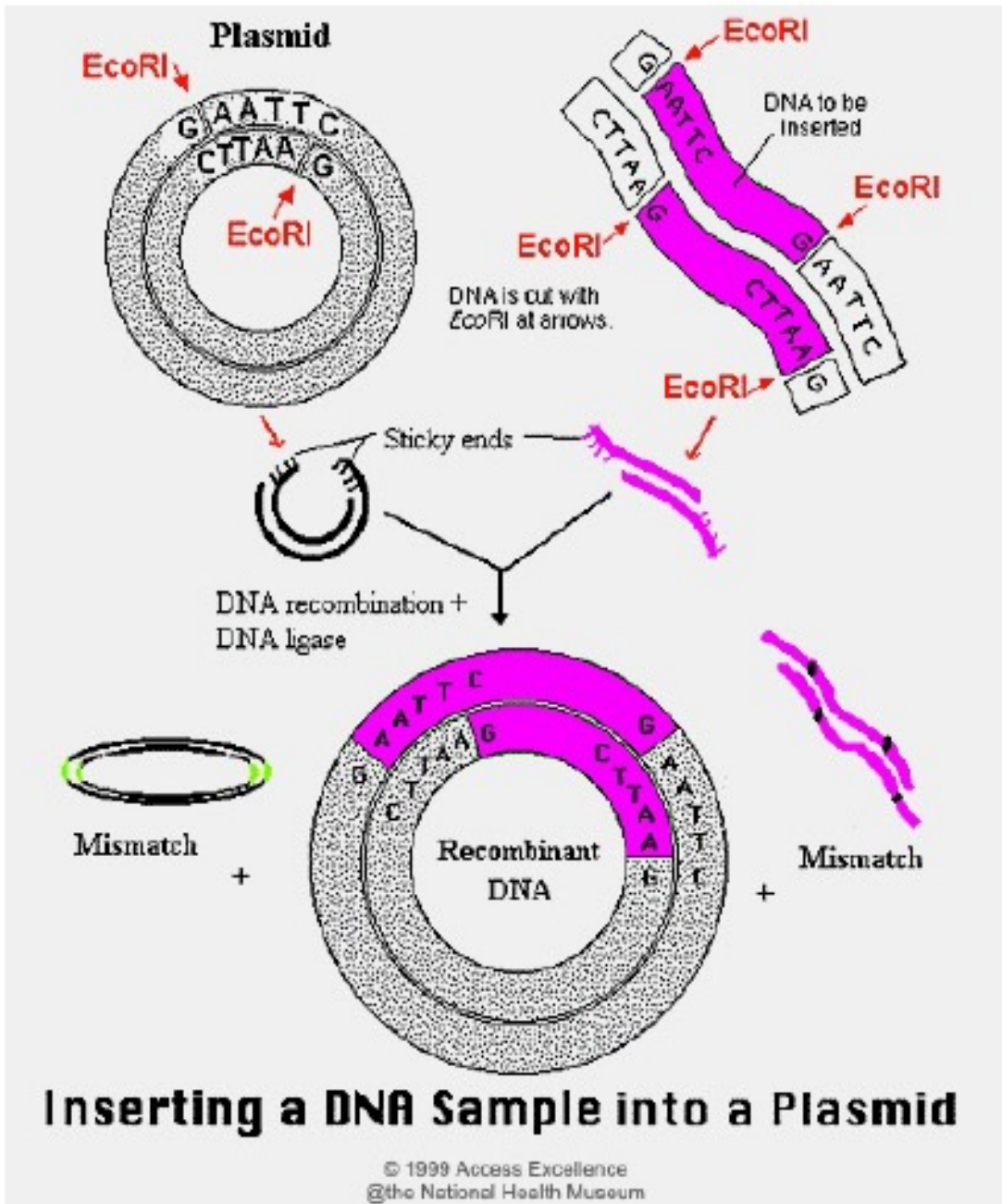
Le processus de **production de protéines recombinantes** dépend fortement du processus d'insertion du segment d'ADN dans le génome de l'hôte. Deux méthodes sont connues pour produire de l'ADN recombinant, à savoir le **clonage moléculaire** et la **PCR**.

★ Le clonage moléculaire est un processus utilisé pour insérer un ADN recombinant dans un vecteur (véhicule utilisé pour transférer du matériel génétique) qui répliquera le segment à l'intérieur de l'organisme hôte. Le segment d'ADN peut être isolé d'un procaryote ou d'un eucaryote portant le gène ou la protéine d'intérêt. Après l'isolement du segment d'ADN, il y a sa coupe (avec des enzymes de restriction) et son insertion dans le vecteur plasmidique par ligature. Le produit résultant est maintenant appelé un plasmide recombinant et est maintenant prêt à être inséré dans l'hôte (ex. : la bactérie E. coli). Le clonage moléculaire fonctionne essentiellement sur le principe que toute séquence d'ADN insérée dans le plasmide sera répliquée avec le reste de l'ADN plasmidique.

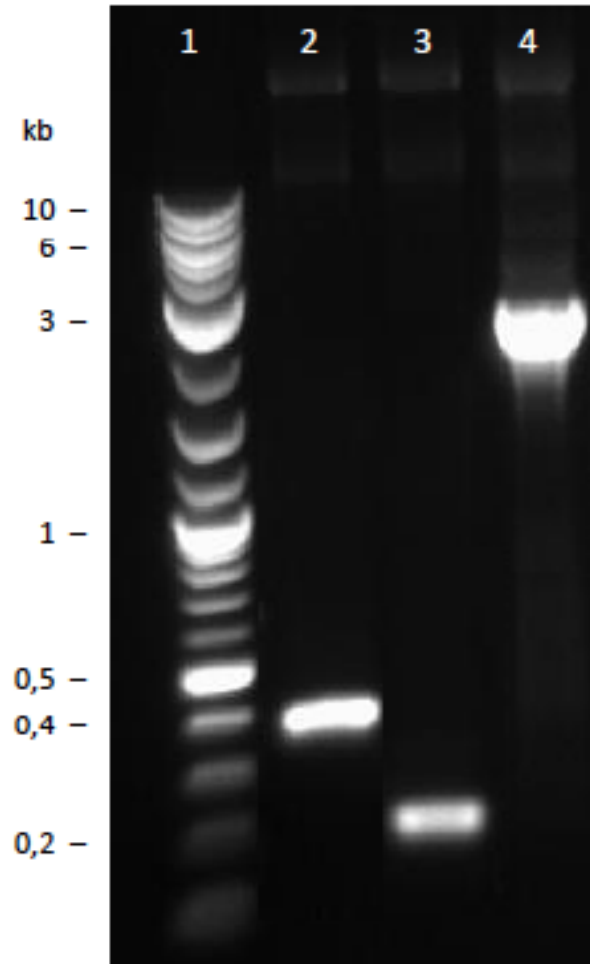
Une protéine recombinante est une protéine produite en utilisant la technologie de l'ADN recombinant. L'ADN recombinant est une technique de biologie moléculaire in vitro qui permet de contrôler à l'acide aminé près la séquence nucléotidique de la protéine que l'on veut produire. On peut également combiner des séquences d'ADN provenant de différentes sources, provenant potentiellement d'espèces différentes, pour créer de nouveaux gènes composites, dits chimériques et des protéines correspondantes.

La production de protéines recombinantes implique plusieurs étapes. Tout d'abord, le gène codant pour la protéine ou le peptide d'intérêt est isolé à partir de l'organisme source et cloné dans un vecteur d'ADN recombinant. Ce nom de « vecteur » vient du fait qu'il est une sorte de véhicule nucléotidique permettant de transporter l'information génétique à l'intérieur d'une cellule « usine » hôte. Le vecteur est généralement un plasmide, de l'ADN circulaire qui peut être répliqué dans une cellule hôte. Ensuite, le vecteur d'ADN recombinant contenant le gène d'intérêt est introduit dans une cellule hôte, telle que des bactéries, des levures ou des cellules de mammifères. Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, le vecteur est répliqué et transcrit en ARN messager (ARNm).

L'ARNm est ensuite « traduit » en protéine par les ribosomes de la cellule hôte. Les codons génétiques (un codon est un groupe de 3 acides nucléiques) sont traduits suivant le code génétique universel. La « traduction » est un terme biologique bien précis qui a lieu au niveau des ribosomes. Les codons de l'ARNm, qui sont les triplets de bases nucléotidiques, sont reconnus par l'anticodon de l'ARN de transfert (ARNt). Les briques de base des protéines sont les acides aminés. L'acide aminé porté par l'ARNt est alors incorporé dans la chaîne polypeptidique en cours de synthèse. La protéine recombinante est ensuite produite en grande quantité, purifiée et utilisée à des fins de recherche, de diagnostic ou de production de médicaments.



| ENZYME           | RECOGNITION SITE        | ENZYME           | RECOGNITION SITE | ENZYME          | RECOGNITION SITE    |
|------------------|-------------------------|------------------|------------------|-----------------|---------------------|
| <i>Aat II</i>    | GAOGI▼C                 | <i>BsrBR I</i>   | GATNN▼NNATC      | <i>Fok I</i>    | GGATG(9/13)         |
| <i>Acc I</i>     | GT▼(A/T)(T/G)AC         | <i>BsrS I</i>    | ACTGGN▼          | <i>Hae II</i>   | (A/G)GCGC▼<br>(T/C) |
| <i>AccII</i>     | T▼OCGGA                 | <i>BssH II</i>   | G▼OGCGC          | <i>HaeIII</i>   | GG▼OC               |
| <i>Acc65 I</i>   | G▼GTAOC                 | <i>Bst71 I</i>   | GCAGC(8/12)      | <i>Hha I</i>    | GOG▼C               |
| <i>Acc87 I</i>   | OCANNNN▼NTGG            | <i>Bst98 I</i>   | C▼TTAAG          | <i>Hinc II</i>  | GT(T/C)▼(A/G)AC     |
| <i>Acy I</i>     | G(A/G)▼OG(T/C)C         | <i>Bst E II</i>  | G▼GTNAOC         | <i>Hind III</i> | A▼AGCTT             |
| <i>Age I</i>     | A▼OCGGT                 | <i>Bst O I</i>   | OC▼(A/T)GG       | <i>Hinf I</i>   | G▼ANTC              |
| <i>Alu I</i>     | AG▼CT                   | <i>Bst X I</i>   | OCANNNN▼<br>NTGG | <i>Hpa I</i>    | GTT▼AAC             |
| <i>A/w26 I</i>   | G▼TCTC(1/5)             | <i>Bst Z I</i>   | C▼GGOCG          | <i>Hpa II</i>   | C▼OGG               |
| <i>A/w44 I</i>   | G▼TGCAC                 | <i>Bsu36 I</i>   | OC▼TNAGG         | <i>Hsp92 I</i>  | G(A/G)▼<br>OG(T/C)C |
| <i>Apa I</i>     | GGGOC▼C                 | <i>Cfo I</i>     | GOG▼C            | <i>Hsp92 II</i> | CATG▼               |
| <i>Ava I</i>     | C▼(T/C)CG(A/G)G         | <i>Cla I</i>     | AT▼OGAT          | <i>I-Ppo I</i>  | CTCTCTAA▼<br>GGTAGC |
| <i>Ava II</i>    | G▼G(A/T)OC              | <i>Csp I</i>     | OG▼G(A/T)OCG     | <i>Kpn I</i>    | GGTAC▼C             |
| <i>Ba I</i>      | TGG▼OCA                 | <i>Csp 45 I</i>  | TT▼OGAA          | <i>Mbo I</i>    | ▼GATC               |
| <i>BamH I</i>    | G▼GATOC                 | <i>Dde I</i>     | C▼TNAG           | <i>Mbo II</i>   | GAAGA(8/7)          |
| <i>Ban I</i>     | G▼G(T/C)(A/G)OC         | <i>Dpn I</i>     | G▼A▼TC           | <i>Mlu I</i>    | A▼OGCGT             |
| <i>Ban II</i>    | G(A/G)GC(T/C)▼C         | <i>Dra I</i>     | TTT▼AAA          | <i>Msp I</i>    | C▼OGG               |
| <i>Bbu I</i>     | GCA TG▼C                | <i>EdHK I</i>    | GACNNN▼NNGTC     | <i>MspA I</i>   | C(A/C)G▼<br>C(G/T)G |
| <i>Bcl I</i>     | T▼GATCA                 | <i>Eco47 III</i> | AOG▼GCT          | <i>Nae I</i>    | GOC▼GGC             |
| <i>Bgl I</i>     | GOCNNNN▼NGGC            | <i>Eco52 I</i>   | C▼GGOCG          | <i>Nar</i>      | GG▼OGCC             |
| <i>Bgl II</i>    | A▼GATCT                 | <i>Eco72 I</i>   | CAC▼GTG          | <i>Nd I</i>     | OC▼(G/C)GG          |
| <i>BsaM I</i>    | GATTGCN▼                | <i>EcoI CR I</i> | GAG▼CJC          | <i>Nco I</i>    | C▼CATGG             |
| <i>BsaO I</i>    | OG(A/G)(T/C)▼OG         | <i>EcoR I</i>    | G▼AATTC          | <i>Nde I</i>    | CA▼TATG             |
| <i>Bsp1286 I</i> | G(G/A/T)GC(C/A/T)▼<br>C | <i>EcoR V</i>    | GAT▼ATC          | <i>NgoM I</i>   | G▼OCGGC             |



**Figure : Electrophorèse sur gel d'agarose 1%. Contrôle de l'intégrité du plasmide recombinant**

### ***Séquençage de l'ADN***

Le séquençage de l'ADN est réalisé en utilisant la méthode de Sanger. Les résultats de séquençage sont analysés à l'aide du logiciel Chromaspro113 et comparés à des bases de données (NCBI Blast).

Décongeler 200  $\mu$ L de bactéries compétentes.

### **Souches bactériennes**

- **E. coli BL21 (DE3)**,
- Rosetta 2 (DE3)
- Rosetta-gami 2 (DE3) sont utilisées pour sur-exprimer la protéine

Ajouter 10 ng de plasmide.

2. Laisser incuber dans la glace pendant 1 h.

3. Incuber à 42°C pendant 2 min.

4. Ajouter 1 mL de milieu de culture stérile, mélanger par aller-retour. Incuber 1 h à 37°C.

5. Centrifuger à 3 000 g pendant 3 min à température ambiante.

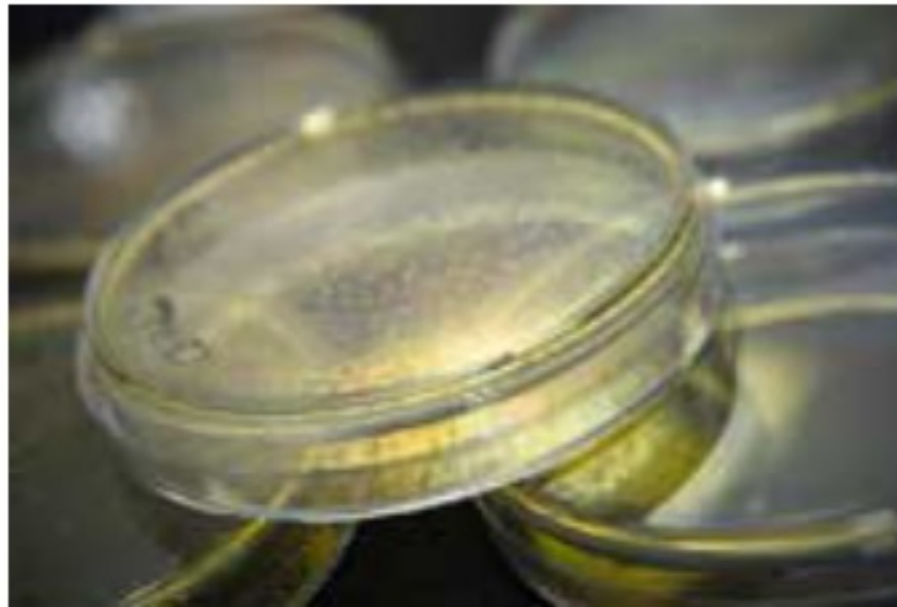
6. Eliminer 1 mL de surnageant. Reprendre délicatement le culot avec les 200 µL restants.

7. Inoculer 2 boîtes de cultures avec 100 µL de bactéries chacune. Les boîtes de cultures doivent contenir du milieu de culture et l'antibiotique de sélection.

Laisser incuber 15 min à 37°C,



Les bactéries ayant intégré le plasmide recombinant sont inoculées dans 10 ml de milieu LB (Luria Broth, 1% de tryptone, 0,5% d'extrait de levure et 0,5% de chlorure de sodium) contenant de l'ampicilline à une concentration de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Les cultures sont incubées sous agitation (200 rpm) toute la nuit à 37°C. Ces précultures servent à ensemencer 1 l de milieu de culture supplémenté de l'antibiotique.



\* Les cultures sont incubées à 37°C sous agitation. Lorsque la densité optique à 600 nm atteint 0,8-1, la température est abaissée à 30°C et l'expression de la protéine est induite par l'ajout d'IPTG (isopropyl-B-D –thiogalactopyranoside) à une concentration de 1 mM.

\* Après 3 h d'incubation à 30°C, les bactéries sont sédimentées par centrifugation (8200 x g pendant 15 min à 4°C), resuspendues dans du tampon 50 mM HEPES, 0,5 M NaCl, pH 7,4, et lysées par sonication.

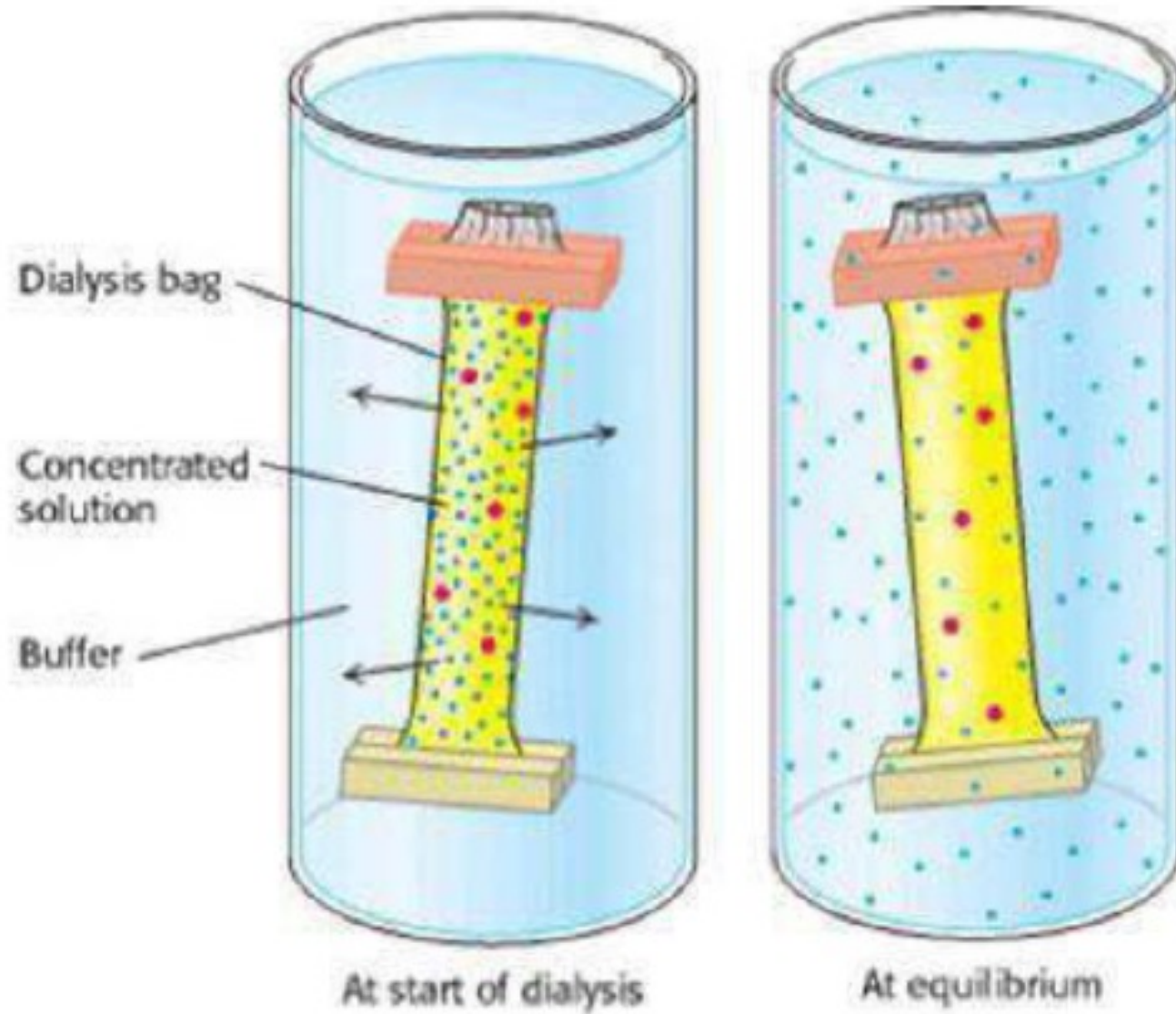
Les protéines fixées sont ensuite éluées sur 30 fois le volume de la colonne grâce au passage d'un gradient linéaire d'Imidazole (de 0 à 110 mM) à travers la résine. Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont réunies et dialysées dans du tampon 20 mM Tris-HCl pH 7,5.

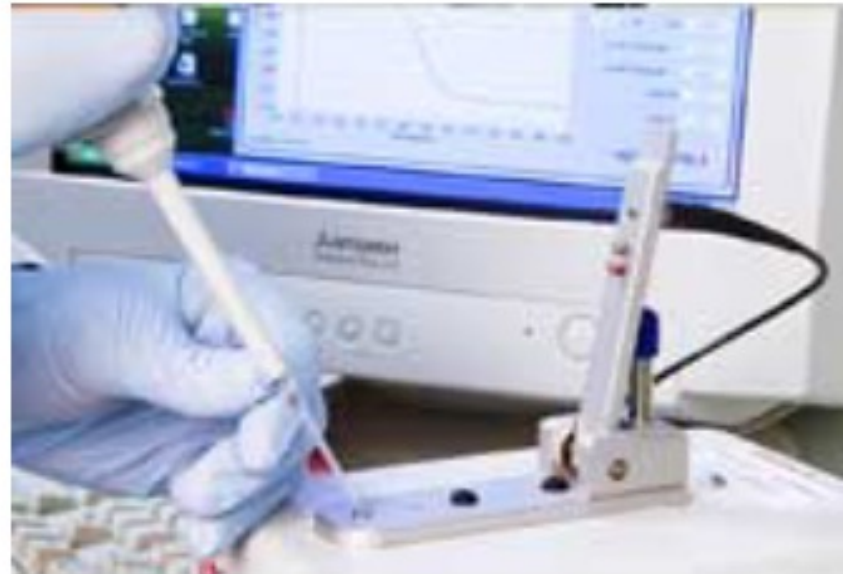
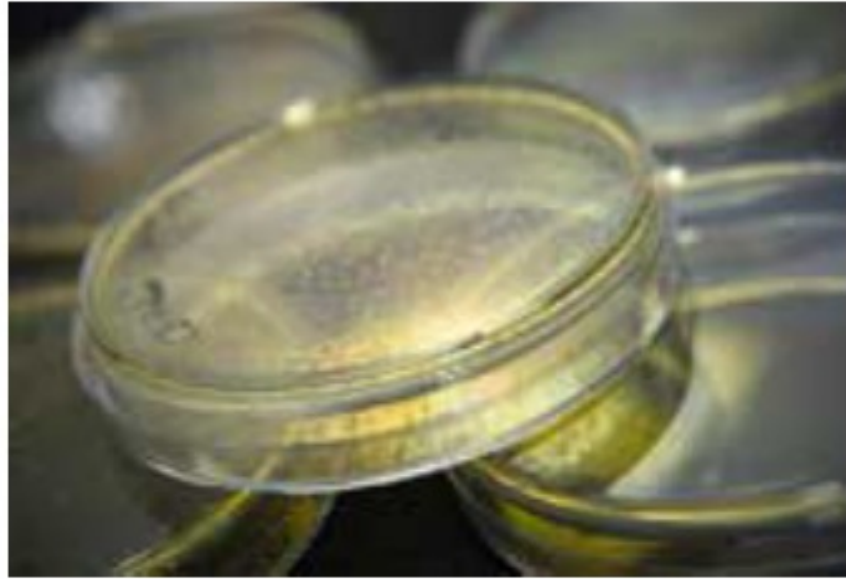
Dans

# DIALYSE

Il se produit souvent qu'une préparation de macromolécules contienne différents produits dont on veut se débarrasser. Ces produits, sels, glucides, détergents ou autres petites molécules, étaient présents dans la préparation initiale ou ont été introduits lors d'une étape de la purification. Une façon simple d'éliminer ces petites molécules est la dialyse. Les molécules de petite taille qui traversent la membrane du sac à dialyse sont qualifiées de diffusibles. Celles qui sont trop grosses sont dites non diffusibles.

# 1- Dialyse





| Reagents            | F-concentration |
|---------------------|-----------------|
| HEPES pH 7.6        | 10 mM           |
| MgCl <sub>2</sub>   | 3 mM            |
| glycerol            | 5%              |
| KCl                 | 40 mM           |
| DTT                 | 1 mM            |
| protease inhibitors | 1x              |



## GEL

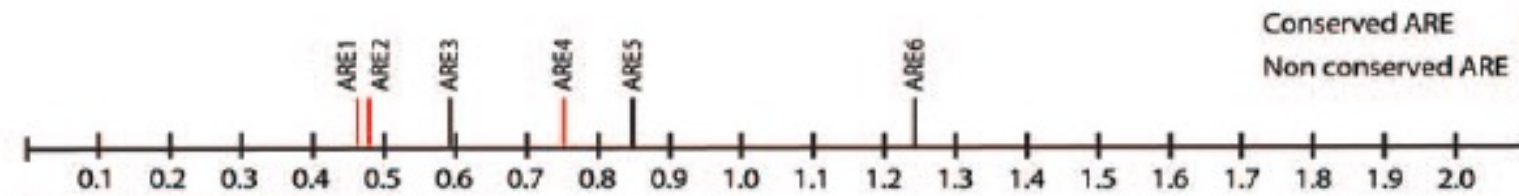
| Reagents                  | F-concentration | Quantity    | I-concentration |
|---------------------------|-----------------|-------------|-----------------|
| acrilammide-bis (29:1)    | 6%              | 10 ml       | 40%             |
| TBE (Tris Borate buffer ) | 0,3X            | 1,5 ml      | 10X             |
| Ammonio Persolfato        |                 | 300 $\mu$ l | 10%             |
| TEMED                     |                 | 30 $\mu$ l  |                 |

## Loading Buffer 6X

| Reagents                  | F-concentration | Quantity | I-concentration |
|---------------------------|-----------------|----------|-----------------|
| Tris HCl pH 7,5           | 30 mM           |          |                 |
| saccarosio                | 40%             |          |                 |
| TBE (Tris Borate buffer ) | 5X              |          |                 |
| bromofenolo               | 0,2%            |          |                 |
| EDTA pH 8                 | 0,001M          |          |                 |



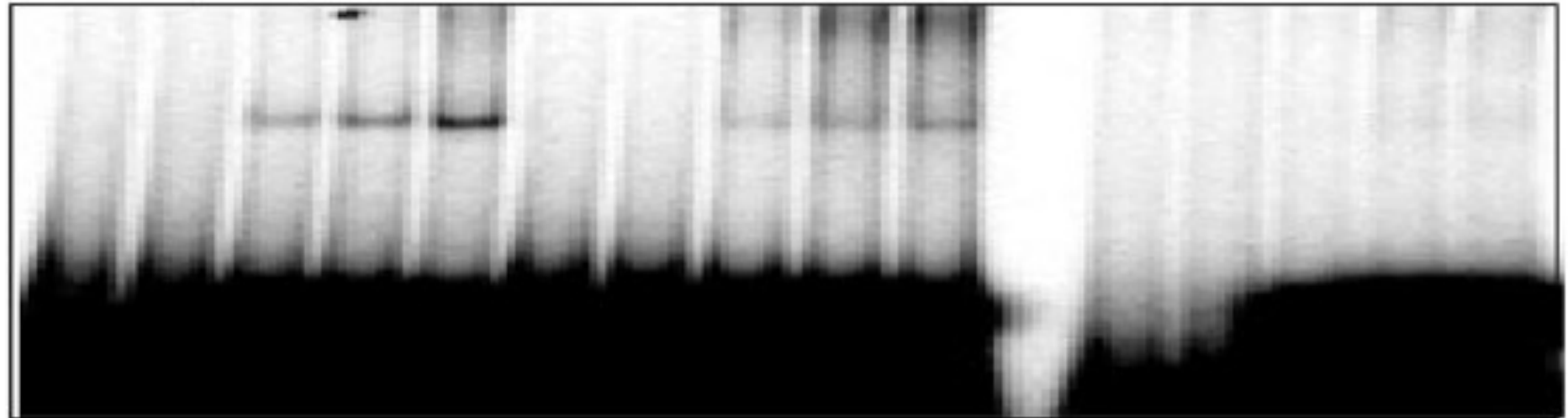
**A**



Transcript ENSMUST00000064997

|              | <u>ARE 1</u>             |              | <u>ARE 2</u>              |              | <u>ARE 4</u>                                   |
|--------------|--------------------------|--------------|---------------------------|--------------|------------------------------------------------|
| H Sapiens    | TGGTT <b>A</b> TTTATAAT- | H Sapiens    | TGG <b>T</b> TTATTTATAATT | H Sapiens    | AATT <b>A</b> TTT <b>A</b> TTT <b>T</b> TATGT  |
| R Norvegicus | GGTT <b>A</b> TTTATAAAT  | R Norvegicus | GGT <b>T</b> TTATTTATAAAT | R Norvegicus | TC <b>T</b> TTATTT <b>A</b> TTT <b>T</b> CATCT |
| M Musculus   | TGGTT <b>A</b> TTTATAAAT | M Musculus   | TGG <b>T</b> TTATTTATAAAT | M Musculus   | TC <b>T</b> TTATTT <b>A</b> TTT <b>T</b> CATCT |

|              |   |   |     |     |     |   |   |     |     |     |   |   |     |     |     |
|--------------|---|---|-----|-----|-----|---|---|-----|-----|-----|---|---|-----|-----|-----|
| 3'UTR ARE1&2 | + | + | +   | +   | +   | - | - | -   | -   | -   | - | - | -   | -   | -   |
| 3'UTR ARE4   | - | - | -   | -   | -   | + | + | +   | +   | +   | - | - | -   | -   | -   |
| 3'UTR AREnc  | - | - | -   | -   | -   | - | - | -   | -   | -   | + | + | +   | +   | +   |
| GST - KSRP   | - | - | 100 | 200 | 300 | - | - | 100 | 200 | 300 | - | - | 100 | 200 | 300 |
| GST          | - | + | -   | -   | -   | - | + | -   | -   | -   | - | + | -   | -   | -   |



**B**

