

## Isolation of total RNA

1. **TRIZOL<sup>®</sup> Reagent**
2. **Isolierung von Gesamt- RNA (ohne Kit), (Modif. nach Chomczynski u. Sacchi, 1987)**
3. **Gesamt- RNA- Präparation durch schrittweise Fällung aus Gewebe oder großen Zellmengen**
4. **Isolierung von poly A<sup>+</sup>- RNA**

### **Introduction:**

**Yields to expect: 1-3 µg of total RNA/mg of tissue. Keep in mind that mRNA represents 1-3 % of total RNA. Methods 1 and 2 are equivalent.**

**For standard preparations of RNA, from which you expect <1.000 µg of total RNA, use method 1. If larger amounts of total RNA are required, you must use protocol 3 (one mouse liver for example gives 4-5 mg of total RNA.**

**For most applications (cDNA synthesis, Northern blotting, hybrid selection), total RNA is fine. In cases where large amounts of mRNA are needed, enrichment by oligo dT selection (protocol 4) is needed.**

**Whatever method you use, RNA is always stored as EtOH precipitate. This means that the final RNA, resuspended in ultrapure Sigma water, is reppt. with 0.1 vol. of 3 M NaAc, 2 vol. EtOH and stored at -20°C. If RNA is needed, vortex this suspension and remove appropriate amount in fresh tube. Then spin as usual, wash with 70 % EtOH, air-dry and resuspend in Sigma water for further use.**

### **1. TRIZOL<sup>®</sup> Reagent**

The protocol should not be used for large numbers of cells (more than 50 Mio.) or more than 1 g of tissue. In this case, refer to “stepwise RNA preparation protocol!

#### **1.1 Homogenization:**

##### **a. Tissue:**

Homogenize tissue samples in at least **1 mL TRIZol Reagent per 50-100 mg** of tissue using a **Polytron** for 2 min at full speed (cool intermittently). *Polytron: Use safety goggles! Before and*

*after use: run for 1 min in 10 N NaOH, followed by 2-3 x washes with sterile water. Finally, rinse with EtOH.* The sample volume should not exceed 10% of the volume of TRIzol reagent used for homogenization. It is always better to use more Trizol in order to improve yield and purity of RNA. **Always add Vanadyl-Ribonucleotide** (200 mM stock, Invitrogen) at 5 mM final concentration as additional protection against RNase.

#### **b. Cells grown in monolayer:**

Wash cells with sterile PBS. Lyse cells directly in a culture dish by adding 1 mL TRIzol reagent per 10 cm<sup>2</sup>. (*The amount of TRIzol reagent added is based on the area of the culture dish, at least →1mL / 10 cm<sup>2</sup>. An insufficient amount of TRIzol reagent results in contamination with DNA and low yield.*)

Pass the cell lysate several times through a pipette and use polytron instantly. Never trypsinize cells for RNA prep.! If you need to collect cells, scrape them.

#### **c. Cells grown in suspension:**

Pellet cells by centrifugation.

Wash cells with sterile PBS before adding TRIzol. Use 1 mL of TRIzol Reagent per 5-10 x 10<sup>6</sup> of animal or plant cells; 1 x 10<sup>7</sup> bacterial cells. Pass the cell lysate several times through a pipette and use polytron instantly.

#### **Optional:**

An additional isolation step may be required for samples with high content of protein. Remove insoluble material by centrifuging at 12.000 x g for 10 min. at 4°C. The supernate contains the RNA. Transfer the cleared homogenate to a fresh tube. Continue with phase separation step.

### **1.2 Phase separation:**

- **Incubate** the homogenized samples for **5 min at 15-30°C** to permit complete dissociation of nucleoprotein complexes.
- **Add 0,2 mL of chloroform** (per 1 mL TRIzol). Close lid. Shake tubes vigorously by hand for approx. 15 sec. and incubate at 15-30°C for 2-3 min.
- **Centrifuge** samples at 12.000 x g for 10 min. at 4°C → Phase separation appears.
  - lower red Phase = phenol-chloroform (organic)
  - interphase

colorless upper aqueous phase = RNA

- Carefully transfer all aqueous phase into fresh tube.

### 1.3 RNA precipitation:

- **Transfer** upper phase to a fresh tube (save organic phase if isolation of DNA / protein is desired).
- Mix with **Isopropanol: 0,5 mL** isopropanol (per 1 mL TRIzol). Incubate at RT for 10 min → centrifuge at 12.000 x g for 10 min at 4°C.
- RNA precipitate forms a gel-like pellet on side and bottom.

### 1.4 RNA Wash: (~EtOH preequilibrated at 4°C)

- Remove supernatant
- Wash RNA pellet 1x with 75% EtOH, (at least 1 mL per 1mL TRIzol)
- Mix by vortexing
- centrifuge at no more than 7.500 x g for 2 min. 4°C.
- Air-dry the pellet

### 1.5 Redissolving the RNA:

Dissolve RNA in appropriate vol. (100- 1.000 µl) of RNase free water („RNA grade“) by passing a few times through pipette and incubating for 5-10 min. at 55-60°C. Reextract at least 1 x with Ph/Chl: Add RNA grade water to 500-1.000 µl and 1 µl of glycogen. Add 0.8 vol. of Ph/Chl, vortex 10 sec. And spin 5 min at 12.000 x g. Transfer supernatant in fresh tube. If there's still interphase or dark colour (from Vanadyl-ribonucleotide), repeat this step.

Then, add 1 vol. of Chl., vortex and spin as above. Transfer supernatant in fresh tube. Add 0.1 vol. of 3 M NaAc and 2 vol of EtOH. Mix and spin 10 min at 12.000x g. Discard supernatant and wash RNA pellet with 0.5 ml of 70 % EtOH. Vortex, spin briefly and remove spnt completely. Air-dry. Resuspend in 100-500 µl of RNA grade water.

### 1.6 Photometry and storage:

Determine amount by **photometry** (use microcuvettes, Photometry in TE ( $1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 40 \text{ }\mu\text{g/ml}$  RNA; OD 260/280 should be more than 2) and quality by electrophoresis (Load 1, 2 and 5  $\mu\text{l}$ ).

**For storage**, add 0.1 vol of 3 M NaAc pH 5.5, 2 vol. EtOH, mix and keep at  $-20^\circ\text{C}$ .

**Never store RNA in water!**

To remove a given amount of RNA for experiments: vortex briefly, remove desired amount of suspension and transfer in Eppendorf tube. If working with less than 10  $\mu\text{g}$ , add 1  $\mu\text{l}$  glycogen. Spin 10 min at 14.000 rpm at RT, remove spnt. Wash 1 x with 70 % EtOH, spin briefly, discard and air-dry RNA pellet.

**Remarks:**

1. Isolation of RNA from small quantities of tissue  $\rightarrow < 1$  to 10 mg or cells  $< 10^2$  to  $10^4$  add 800  $\mu\text{l}$  of TRIzol Reagent to the tissue or cells !

Add 20  $\mu\text{g}$  glycogen with final concentration in TRIzol of 250  $\mu\text{g/mL}$ . The glycogen remains in the upper aqueous phase.

## **2. Isolierung von Gesamt- RNA (ohne Kit)**

(Modif. nach Chomczynski u. Sacchi, 1987)

**Kulturzellen:** Entweder Zellen trypsinieren und Zellpellet 1 x mit PBS waschen oder Zellen direkt lysieren. In diesem Fall Schalen 2 x mit PBS waschen und PBS vollständig entfernen.

Pro 10 cm- Schale (bzw. 75 ml- Flasche) mindestens 0.5 ml GTC- Puffer plus Vanadyl-rNTPs auf 5 mM Endkonzentration) zugeben.

**Gewebe:** Sofort entnehmen und in flüssigem Stickstoff einfrieren. Pro g Gewebe etwa 10 ml GTC- Puffer (plus Vanadyl-NTPs auf 5 mM Endkonzentration) zugeben.

**Aufschluß:** Zellen bzw. Gewebe sofort 1-2 min. homogenisieren (Polytron). Sarcosyl auf 0.5 % Endkonz. zugeben, kurz mischen. Feste Bestandteile 5 min. bei 5000 rpm abzentrifugieren. Überstand in neues Röhrchen überführen. Volumen bestimmen.

**Reinigung:** 0.1 Volumen 2 M NaAc pH 4 und 1 Volumen kaltes, wassergesättigtes Phenol zugeben, 30 sec. vortexen. 0.3 Vol. (bezogen auf Ursprungsvolumen) Chloroform zugeben, vortexen. 15 min auf Eis inkubieren, dann 10 min bei 14 000 rpm (4°C) zentrifugieren. Übstd. in neue/s Röhrchen.

0.6 Vol. wassergesättigtes Phenol, 0.2 Vol. Chloroform zugeben. Vortexen. 2 min 14 000 rpm (RT) zentrifugieren (Eppendorf- Gefäße). Alternativ kann in Falconröhrchen für 10 min bei 5 000 rpm zur Phasentrennung zentrifugiert werden. Übstd. in neue/s Röhrchen. Mindestens noch einmal wiederholen.

2 x mit 1 Vol. Chloroform extrahieren und wie zuvor vortexen und zentrifugieren.

Wäßrige Phase mit 1 Vol. Isopropanol oder 2 Vol. Ethanol versetzen, mischen (falls weniger als 5 µg/ml RNA erwartet wird, 2 µl Glykogen zugeben). 10-15 min. bei 14 000 rpm (RT) zentrifugieren. Pellet 2 x mit 0.5 ml 70 % EtOH waschen (vortexen), dann Alkohol vollständig entfernen und RNA lufttrocknen.

In 100-1000 µl sterilem Wasser ("RNA grade") aufnehmen. 1, 2 und 5 µl für Gelanalyse bzw. entfernen.

**Photometrie (1 OD<sub>260nm</sub> = 40 µg/ml Einzelstrang-RNA; OD 260/280 soll besser als 2 sein)**

RNA immer als Präzipitat bei -20°C aufbewahren: 0.1 Vol. 3 M NaAc pH 5.5 und 2 Vol. EtOH zugeben, mischen. Daraus wird benötigte Menge nach Vortexen als Suspension entnommen, wie beschrieben zentrifugiert, gewaschen und getrocknet. Bei der Entnahme von weniger als 10 µg vor dem Zentrifugieren 1 µl Glykogen zugeben.

**Pufferlösungen und Bemerkungen:**

GTC-Puffer: 4.5 M Guanidinium- Isothiocyanat (ultrapur)  
25 mM Natriumcitrat pH 7.5  
20 mM DTT  
10 mM EDTA

bei -20°C aufbewahren.

2 M NaAc pH 4 und 3 M NaAc pH 5.5 mit RNase-freiem Wasser ansetzen und autoklavieren. Polytron vor und nach Gebrauch mit 10 M NaOH säubern (und mechanisch). Danach gründlich mit deion. Wasser waschen.

Methode ist für sehr kleine Zell- und Gewebemengen gut geeignet. Wenn RNA- Ausbeuten von mehr als 1 mg erwartet werden (z. B. Mausleber), ist die selektive Fällungsmethode besser geeignet.

Alle Chemikalien und Reagenzien müssen RNase-frei sein.

1 OD<sub>260</sub> entspricht 40 µg/ml RNA.

OD 260/280 nm sollte >2 sein.

### **3. Gesamt- RNA- Präparation durch schrittweise Fällung aus Gewebe oder großen Zellmengen**

Alle Lösungen mit autoklaviertem Wasser ansetzen, in sterilen Gefäßen und wenn möglich autoklavieren. Gefäße und Gelkammern können mit RNase Erase RNase-frei gemacht werden.

Vor-, Nachbehandlung des Homogenisators: in 10 N NaOH für 1 Minute laufen lassen, dann 2-3 x mit destilliertem Wasser spülen und mit EtOH abspritzen.

#### *I. Präparation des Gewebes*

1. 5-10 ml GHCl pro 1 g Gewebe zu der Probe geben. Vanadyl-Ribonucleotid auf 5 mM Endkonzentration zugeben.
2. 1-3 Minuten bei hoher Geschwindigkeit homogenisieren (in einem 50- oder 250 ml Zentrifugenbecher). Ausgangsvolumen messen (=1 Volumen).

3. Sarcosyl auf eine Endkonzentration von 2 % (zuvor 20 Minuten/80°C erhitzen) zugeben und mischen, dann mit 0,5 Vol. EtOH mischen und bei -20°C **ÜN** lagern.

## *II. Weitere Präzipitationen*

1. Proben auftauen und 10 Minuten bei 15 000 rpm / 4°C zentrifugieren (Sorvall bzw. Beckman-Zentrifuge). Überstand verwerfen.
2. Pellet in 0,5 vol. GHCl resuspendieren (wäßriges Ausgangsvolumen = 1), 1-2 Minuten homogenisieren und dann 1/2 Vol. EtOH zugeben. Bei -20°C **ÜN oder mindestens 4 Stunden** lagern.
3. Auftauen und zentrifugieren wie unter II.1 beschrieben.
4. In 0,25 Vol. resuspendieren, homogenisieren, 1/2 Vol. EtOH zugeben und bei -20°C **ÜN oder mindestens 4 Stunden** lagern. Zentrifugieren wie unter II.1.

## **III. Reinigung der Gesamt-RNA**

1. Pellet 2 x mit 70% EtOH und 1 x mit EtOH abs. waschen, trocknen lassen.
2. Pellet **schnell** in 0,5–2 ml TE/0,2 % SDS (autoklaviert) plus 5 mM Vanadyl-Ribonukleotid resuspendieren, wenn nötig auf 65°C erhitzen und mit Glas-Homogenisator nachhelfen. **Wenn RNA vollständig resuspendiert, sofort mit Schritt 4 weitermachen.**
3. Für "hartes" Gewebe (wie Epidermis): Proteinase K auf eine Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugeben, auf 1 mM CaCl<sub>2</sub> einstellen und bei 55°C 2 Stunden inkubieren.

## **IV. Phenol/Chloroform-Extraktion**

4. 0,8 Vol. Phenol (TE-gesättigt bei pH 7,5)/Chloroform (1:1 Gemisch) zugeben, 30 sec vortexen, 3 Minuten zentrifugieren.
5. Wäßrige Phase in neues Röhrchen überführen und Schritt 4 mindestens 1 x wiederholen.
6. Mit 1 Vol. Chloroform extrahieren, wiederholen, falls Interphase bestehen bleibt.
7. 0,1 Vol. NaAc hinzugeben, mischen, 2 Vol. EtOH zugeben, für 10 Minuten / 14 000rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge).
8. Überstand verwerfen und 2 x mit 70% EtOH waschen. Dann EtOH vollständig entfernen, das Pellet trocknen und in 100-1000 µl sterilem Wasser ("RNA grade") aufnehmen. 1, 2 und 5 µl für Gelanalyse bzw. entfernen.

**Photometrie (1 OD<sub>260nm</sub> = 40 µg/ml Einzelstrang-RNA; OD 260/280 soll besser als 2 sein)**

RNA immer als Präzipitat bei -20°C aufbewahren: 0.1 Vol. 3 M NaAc pH 5.5 und 2 Vol. EtOH zugeben, mischen. Daraus wird benötigte Menge nach Vortexen als Suspension entnommen, wie beschrieben zentrifugiert, gewaschen und getrocknet. Bei der Entnahme von weniger als 10 µg vor dem Zentrifugieren 1 µl Glykogen zugeben.

**GHCl-Puffer:** 7.5 M Guanidinium- hydrochlorid (ultrapur)  
0.1 M Natriumacetat pH 5.8  
20 mM DTT  
10 mM EDTA  
bei -20°C aufbewahren.

## **4. Isolierung von poly A<sup>+</sup> - RNA**

- 1. Pro 1 g Gewebe können 1-3 mg Gesamt- RNA erwartet werden. Davon sind 1-3 % poly A<sup>+</sup>- RNA. 1 g Oligo dT- Cellulose Typ 7 (Pharmacia) bindet etwa 4 mg poly A in 10 mM Tris- Cl pH 7.5/ 500 mM NaCl; d.h. für Mengen an Gesamt- RNA (ab 1 mg aufwärts) reichen 0.2 g Säulenmaterial, für kleinere Mengen 50- 100 µg.**
- 2. Alle Puffer und Materialien müssen steril sein (Alle Puffer mit RNase- freiem Wasser herstellen. Zügig arbeiten.**
- 3. Säulchen steril entnehmen, dT- Cellulose abwiegen und einfüllen.**
- 4. Säule mit 20 ml Elutionspuffer waschen.**
- 5. Säule mit 20 ml Bindungspuffer waschen.**
- 6. Etwa 15 Eppendorfgefäße numerieren.**
- 7. Gesamt- RNA fällen, waschen und auf 0.5 mg/ml in sterilem Wasser einstellen. 5 min bei 65°C erhitzen. Schnell auf Eis abkühlen.**
- 8. Mit 5 M NaCl auf 0.5 M Endkonz. einstellen, mischen.**
- 9. RNA auf Säule geben. Durchlauf auffangen und nochmals auf Säule geben. Zweiten Durchlauf zur Sicherheit auffangen (diese Fraktion kann als Marker (28/18 S rRNA) verwendet werden).**
- 10. Säule mit 10 - 50 ml Bindungspuffer waschen (Mindestvolumen = 15 x Bettvolumen).**

11. Säule mit 5- 10 ml Elutionspuffer (Mindestvolumen = 5 x Bettvolumen) in 1 ml- Fraktionen eluieren. Von jeder Fraktion 50 µl entnehmen und OD<sub>260</sub> nm bestimmen; relevante Fraktionen vereinigen (1 OD<sub>260</sub> RNA = 40 µg/ml).
12. Entweder Schritt 9-11 wiederholen (falls sehr reine poly A<sup>+</sup>- Fraktion nötig) oder RNA gleich durch Fällung konzentrieren:
13. 0.1 Vol. 3 M NaAc pH 5.5 und 2 Vol. EtOH zugeben, mischen. 10 min bei 14 000 rpm in Tischzentrifuge oder 18 000 rpm in präparativer Zentrifuge (nur bei großen Mengen) zentrifugieren. Übst. entfernen und Pellet einmal mit 1-2 ml 70 % EtOH waschen. Kurz zentrifugieren und EtOH vollständig entfernen. Lufttrocknen und in 50- 500 µl Wasser aufnehmen. Aliquot für OD- Messung wegnehmen. Rest wie zuvor fällen. Als Präzipitat bei -20°C aufbewahren.
14. Säule kann 5-6 x benutzt werden. Dazu muß sie sofort nach Gebrauch regeneriert werden: Falls Säule innerhalb 1 Woche wieder benutzt wird: Mit 50 ml Elutionspuffer + 0.1 % Na.- azid waschen. Etwas Puffer auf Säule stehenlassen und bei 4°C aufbewahren. Falls späterer Gebrauch: Waschen wie zuvor; dann 10 ml steriles Wasser zugeben. Säulenmaterial aufwirbeln, in Falconröhrchen überführen, absetzen lassen. Wasser vorsichtig mit Pipette entfernen und Säulenmaterial in Lyophylle trocknen. Bei 4°C aufbewahren.

**Bindungspuffer:** 10 mM Tris-Cl pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 0.5 M NaCl

**Elutionspuffer:** 10 mM Tris-Cl pH 7.5, 0.1 mM EDTA