

RNA- Isolierung:

a. Cells grown in monolayer:

Wash cells with sterile ice-cold PBS. Lyse cells directly in a culture dish by adding 1 mL TRIzol reagent per 10 cm². (The amount of Trizol reagent added is based on the area of the culture dish, at least → 1 mL / 10 cm². An insufficient amount of TRIzol reagent results in contamination with DNA and low yield.)

1 ml	3.5 cm
3 ml	6 cm
8 ml	10 cm

b.

-Gewebe (Haut / Epidermis) sofort nach Präparation in 2ml Eppi mit 800µl Trizol inkl. 25µl Ribonucleoside –Vanadylkomplex (Biolabs. No S 1402S) geben → sofort N2; Lagerung bei – 80°C bis zur Isolierung

-Messer Ultra Thorax 30 min vor Beginn in 1N NaOH einlegen → mit frischem Millipore H2O spülen (3X)

-Probe auf Eis auftauen

-Aufschließen der Probe: 3 x 5 sec. Ultra Thorax höchste Stufe

→ + 200 µl Trizol, Probe auf Eis lagern bis alle Proben fertig sind (max. 12 Proben gleichzeitig präparieren!)

→ Ultra Thorax 3x mit Millipore spülen (frisch!, jeweils nach max 6 Proben wechseln)

→ nächste Probe

-homogenisierte Proben 5 min bei RT stehen lassen (15-30°C)

- +200µl Chloroform (frisch aus Flasche) → 15 sec. Schwenken → 2-3 min bei RT stehen lassen

→ 12000 g 15 min 4°C

-obere farblose Phase in ein neues Eppi (2ml) überführen, + 500µl Isopropanol (RNA!) → mischen → 10min RT

→ 12000 g 10 min 4°C

-ÜS abnehmen und verwerfen

- Pellet mit 1ml eiskaltem 75% EtOH (RNA!) waschen → vortexen → 7600 g 5 min 4°C (Achtung : Pellet nicht fest)

→ ÜS vollständig abnehmen und Pellet bei RT 5 min trocknen (nicht vollständig trocknen, sonst unlöslich!)

-Pellet in 400 µl RNA-Sigma- H2O aufnehmen → auf und ab pipettieren

→ 10 min 55°C Heizblock (geöffneter Deckel) um RNA vollständig zu lösen

-Phenol/ Chloroform-Extraktion: Unbedingt H₂O gesättigtes Phenol, pH4.0 verwenden!!

- +**320 µl** Phenol/CHCl₃ (0.8 Volumina, Mischung 1+1) → vortexen → 5min 12000g 4°C
- Üs in neues Eppi überführen (2ml)
- +**320µl** CHCl₃ → vortexen → 5min 12000g 4°C
- Üs in neues Eppi überführen (1ml)

Fällung:

+ 1µl Glykogen (RNA!)

+ 40µl 3M NaAc, pH (RNA!)

+ 800µl 100% EtOH

→ 30 min auf Trockeneis inkubieren

→ 15 min 14000 rpm 4°C

→ 2x mit 70% EtOH waschen → jeweils 10min 14000 rpm 4°C

-letzten Üs vollständig abnehmen und Pellet 5min bei RT trocknen lassen (soll noch feucht sein!)

-Pellet in 30µl (-50µl) RNA- Sigma H₂O aufnehmen

→ 3 min bei RT stehen lassen → auf und ab pipettieren

→ 10 min 55°C Heizblock (Deckel geöffnet)

Photometrische Konz.bestimmung:

-Proben 1:50 verd.

-für Berechnung beachten,dass OD1 bei 260 40µg/ml RNA entspricht

Agarosegel:

-1%, Kammer und Kamm vorher 30 min in 1N NaOH einlegen → 1X mit frischem millipore H₂O spülen

-normalen TAE Puffer verwenden

-jeweils 200 und 500 ng der Proben auftragen,um gemessene Konz. zu überprüfen (gegebenenfalls danach noch einmal anpassen)

DNase Verdau:

-RNasefreie DNase von **Fermentas** verwenden (Nr. EN 0521; 1U/µl)

-pro Verdau **12µg** RNA einsetzen:

+10µl 10x reaction b.+ MgCl₂

+10µl DnaseI 1U/µl

ad 100µl mit RNA Sigma H₂O auffüllen

→ 30 min 37°C (Heizblock) (keine Hitzeinaktivierung, keine EDTA-Zugabe)

→ direkt Säulenreinigung anschließen

Säulenreinigung für Transkriptionsprofile:

- mit **Qiagen RNeasy Min Elute Cleanup Kit**

- jeweils 100µl Probe s.o. + 350µl RLT-Puffer → mischen
- + 250µl 100% EtOH (RNA)
- mit Pipette mischen
- direkt alles (700µl) auf Säule geben (Rneasy Spin Column in 2ml collecting tube)
- 15" 14000 rpm RT zentrifugieren
- Durchfluß verwerfen
- Spin column in neues 2ml Tube setzen
- + 500µl RPE Puffer
- 15" 14000 rpm RT zentrifugieren
- Durchfluß weg
- + 500µl 80% EtOH (RNA)
- 2 min 14000 rpm RT zentrifugieren
- Durchfluß und 2ml Tube weg
- Säule in neues 2ml Eppi setzen , Deckel öffnen
- 5 min 14000 rpm RT zentrifugieren
- Durchfluß und 2ml Tube weg
- Säule in neues 1,5ml Eppi setzen
- + 14µl RNA Sigma H2O, direkt in Mitte ! der Säule geben
- Deckel zu → 1 min 14000 rpm RT zentrifugieren
- Probe nochmals mit 10µl nachelulieren

- Photometr. Konzbest. + Gel s.o.

Date: **Experiment: semiquantitative PCR (zur Testung vor qPCR)**

SAMPLE NUMBER	COMPONENT																		
	DNA 1 1:10/1:100	4																	
	DNA 2																		
	10 x Buffer	2,5																	
	50 mM MgCl ₂	0,75																	
	5 mM dNTPs	1																	
	Primer 1 10µM	2,5																	
	Primer 2 10µM	2,5																	
	Taq Pol	0,2																	
	H ₂ O up to 25µl	11,55																	

Conditions/PCR machine: PCR 2, Claudia # 12 Q-Test ; mit Öl überschichten !

5' 94°

Denat.: 94° 30" Anneal.: 56° 30" Ext.: 72° 30" Cycle no.: 30x; 72° 7'; 4°

Primer-Stammlösung: 10pMol/μl