

Handschuhe tragen!

Am Tag zuvor:

Falcons mit 10 g Eis befallen und bei -20°C einfrieren

Ethanol abs. (-20°C)

250 mg Glaskügelchen in 2 ml Eppis, 2 x Parafilm (1 x 3 cm)

Frisch, pro Ansatz:

Lysis Buffer: RLT zu je 400 µl RLT-Puffer 4 µl β-Mercaptoethanol hinzufügen

DNase-Mix: 70 µl RDD-Puffer + 10 µl DNase

Falcon-Zentrifuge vorkühlen

- 20 ml Kultur in die -20°C gekühlten und mit Eis beladenen Falcons geben, zentrifugieren: 5 min, max. Speed, 4°C
- Pellet in 350 µl RLT resuspendieren und in ein Eppli mit 250 mg Glaskügelchen füllen, erst 15 s und dann 30 s im Signalat Plus schütteln
- Zentrifugieren: 2 min, max. speed, RT
- Überstand in ein neues Eppli überführen
- 250 µl abs. Ethanol (-20°C) hinzufügen, mischen durch auf- und abpipettieren
- Bis 700 µl ~~DNase~~ Mix auf die Säule geben; zentrifugieren: 15 s 13000 rpm, Durchfluss verwerfen (bei größeren Volumina in zwei Schritten zentrifugieren)
- Säule mit 350 µl Buffer RW1 waschen, zentrifugieren: 15 s rpm, Durchfluss verwerfen
- 78 µl DNase-Mix auf die Säule pipettieren und 15 min bei RT inkubieren
- Säule mit 350 µl Buffer RW1 waschen, zentrifugieren: 15 s rpm, Durchfluss verwerfen
- Säule in ein neues Sammelhüttchen stellen und mit 500 µl Buffer RPE (plus Ethanol) waschen, zentrifugieren: 15 s 13000 rpm, Durchfluss verwerfen
- Säule mit 500 µl Buffer RPE (plus Ethanol) waschen und 2 min bei max. speed zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Säule erneut für 30 s zentrifugieren um den Puffer vollständig zu entfernen
- Elution der RNA mit 40 µl Nuclease-freiem Wasser, zentrifugieren: 1 min bei 13000 rpm
- Erneut mit 40 µl Nuclease-freiem Wasser eluieren (ins gleiche Eppli), zentrifugieren: 1 min bei 13000 rpm

RLT-Puffer + DNase (315 + 45 µl)
200 + 40 µl = 240 µl

Säule, RLT-Eppis, Spülen

RLT-Puffer (120 µl)

Eppis beschaffen

⇒ 3,2 ml RLT + 64 µl DTT (0,5 M)

8 Falcons: 4 x 40 µl RLT + 16 µl DTT (1 M)
2 x 2 ml Eppis: 12 µl RLT + 12 µl

2 x 8 µl + 32 µl

→ DTT, Endkonzentration

10 mM

(48 µl von 2,5 M SL) / 1 M SL
4 µl

1 x 50 µl