

Markierung gesamter bakterieller RNA mit Zufallsprimern (Hexamere)

(Quelle : Arkady Khodursky)

Vorarbeit :

- 15-25 µg Gesamt-RNA DNase-frei in 14 µl H₂O durch Einengung (Speedvac).

Markierung :

- die RNA-Reinheit nach den oben durchgeführten Präp.-Schritten ist absolut wichtig für eine erfolgreiche Markierung !!!
- !!! auf Eis:
20-25 µg RNA in 14 µl mit 500 ng pdN6 Zufallsprimern mischen (Stammlsg. ist auf 500 ng/µl eingestellt = +1µl)
(wenn nötig auf 15 µl Gesamtvolumen mit RNase-freiem H₂O auffüllen)
- **10 min bei 65°C** inkubieren. (inzwischen **Mix für 2 Reaktionen** vorbereiten)
- **2 min auf Eis** inkubieren.
- hinzufügen: je **3 µl** Cy3- bzw. Cy5-dUTP (1mM). (GE value pack PA55322)
(Cy3-dUTP: GE Healthcare Cat# PA53022 [25 nmol], PA53032 [250 nmol])
(Cy5-dUTP: GE Healthcare Cat# PA55022 [25 nmol], PA55032 [250 nmol])
- hinzufügen: je **11,6 µl** RT-Mix durch 3-4-maliges auf – und abpipettieren.

Mix für 2 Reaktionen:

0,1 DTT	6 µl
5x 1st Strand Buffer	12 µl
dNTP-Mix	1,2 µl
(dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 10 mM dTTP)*	
Superscript II	4 µl

* [dNTPs-Lsg.: A | C | G | T | H₂O : 2 | 2 | 2 | 0,8 | 1,2 µl]

- Mischung **10 min bei RT** inkubieren.
- Anschließend **110 min bei 42°C** inkubieren.
- Stopp mit 10 µl 0,1M NaOH, 10 min 70°C, **Neutralisierung (!)** mit 10 µl 0,1M HCl.

Microcon-Aufreinigung:

- 1: Je **450 µl** H₂O auf Amicon Ultra Säule (UFC503096) vorgeben und den jeweils 50µl Markierungs-Ansatz zupipettieren, mixen; ~10 min 14.000xg (Volumen sollte von 500µl auf etwa 20µl eingeengt sein, sonst noch mal 1 bis 2 min zentrifugieren), Durchlauf im Epqi entfernen
- 2: **+480µl** H₂O auf Amicon Ultra Säule Säule geben und vorsichtig mixen; wieder ~10 min 14.000xg (Volumen sollte von 500µl auf etwa <20µl eingeengt sein, sonst noch mal 1 bis 2 min zentrifugieren),
- 3: -Säule in neuem Epqi umdrehen, 2 min **mit maximal 1000 x g** um Produkt ins Epqi abzuschleudern, Sonden vereinigen
 - mit **450 µl** H₂O (final 500µl) auf neue Säule (richtig rum) geben, mixen
 - wieder ~10 min 14.000xg, Durchlauf im Epqi entfernen
- 4:- **+ 480 µl** H₂O (final 500µl), mixen, ~10 min 14.000xg
 - Säule in neuem Epqi umdrehen, 2min 1000xg Produkt abschleudern

Für Hybridisierung Sondenvolumen mit H₂O auf 44 µl einstellen (bei Agilent 4-plex).