

Информация о продукте

Реагент «ЛИРА» для выделения РНК и ДНК (LR-0100, LR-0200)

Описание продукта

Реагент предназначен для выделения РНК и ДНК из различных биологических образцов (эукариотических клеток, микроорганизмов, тканей животных, растений и т.п.). Реагент представляет собой прозрачный раствор, содержащий фенол и гуанидин тиоцианат. Реагент лизирует образец до гомогенной смеси, которая после смешивания с хлороформом разделяется на нижнюю органическую фазу, интерфазу и верхнюю водную фазу. РНК легко осаждается из водной фазы при помощи изопропанола, осаждение ДНК происходит из органической фазы при помощи этанола.

Целостность РНК и ДНК в процессе выделения сохраняется благодаря эффективному подавлению активности РНКаз и ДНКаз реагентом «Лири».

Выделенная РНК может быть использована для ОТ-ПЦР, нозерн блота и других работ.

Выделенная ДНК может быть использована для ПЦР.

Меры предосторожности

Осторожно! Реагент «Лири» содержит фенол и гуанидин тиоцианат, оказывающие раздражающее и токсичное действие. При работе необходимо соблюдать правила общей и личной техники безопасности. Токсичен при попадании на кожу и внутрь. Вызывает ожоги.

Работать под тягой! При попадании на кожу промойте немедленно большим количеством воды и моющего средства (детергента). При необходимости покажитесь врачу.

Материалы и оборудование необходимые для работы

Реагенты и оборудование для выделения РНК и ДНК

Центрифуга способная достигать скорости не менее 12000 g и температуры + 4 °C

Нагревательный блок, поддерживающий температуру до 60 °C.

Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки

Хлороформ

Этанол, 70-80% раствор

Реагенты для выделения РНК

Изопропанол

Вода, очищенная от РНКаз

Ацетат натрия, 3 М раствор. *Необязательно*

Гликоген. *Необязательно*

Реагенты для выделения ДНК

Этанол, 96-100% раствор

0.1 М цитрат натрия в 10% этаноле (рН 8.5)

8-50 мМ NaOH

HEPES

Протокол выделения РНК и ДНК.

1. Для выделения РНК и ДНК из биологического материала необходимо провести полный лизис образца с использованием реагента «Ли́ра» в течение 10 мин. Ниже приведены ориентировочные соотношения реагента «Ли́ра» и количество образца.

1а. Клеточная суспензия.

1. Осадить клетки на центрифуге, удалить супернатант, оставив минимальный объём для суспендирования клеток. Суспендировать клеточную суспензию.
2. Лизировать клеточную суспензию в реагенте «Ли́ра». Выделение проводить в расчёте 1 мл «Ли́ры» на $5-10 \cdot 10^6$ клеточной суспензии. Объём «Ли́ры» должен быть не менее чем в 10 раз больше объёма суспензии.
3. Инкубировать лизат 10 мин при комнатной температуре.

1б. Клеточный монослой.

1. Удалить среду. К клеточному монослою добавить реагент «Ли́ра» в количестве достаточном, чтобы покрыть всю площадь. 1 мл «Ли́ры» на 10 см^2 .
2. Пипетировать лизат несколько раз для гомогенизации. Перенести образец в чистую пробирку.

3. Инкубировать лизат 10 мин при комнатной температуре.

1в. Биомасса бактерий, ткани, растения.

1. Гомогенизировать образец в реагенте «Ли́ра» до получения однородной смеси. При гомогенизации реагент должен полностью покрывать образец. Выделение проводить в расчёте 1 мл «Лиры» на 50-100 мг образца.

Примечание: если не происходит образование однородной суспензии – увеличить количество реагента «Ли́ра».

2. Инкубировать лизат 10 мин при комнатной температуре.

Примечание: при выделении РНК центрифугировать 10 мин, 10000-12000 gcf при 4-25 °С. Перенести супернатант в чистую пробирку, осадок выбросить. Если не отделить нерастворившиеся в «Ли́ре» частицы образца, то в конечном растворе РНК возможна примесь ДНК. При совместном выделении РНК и ДНК не рекомендуется проводить данную стадию.

Примечание: на данной стадии возможно приостановить эксперимент. Лизат можно хранить при -20 °С не менее недели, если работу планируется продолжить в течение суток, образец можно хранить при +4 °С.

2. Добавить 1/5 объёма хлороформа от исходного объёма «Лиры» (200 мкл хлороформа на 1 мл «Лиры»). Плотнo закрыть крышку.

Важно: убедиться, что крышка закрыта плотно, иначе хлороформ может вытечь при переворачивании пробирки.

3. Энергично встряхнуть пробирку в течение 15 с. Инкубировать 5-10 мин, периодически перемешивая вручную. Должна образоваться однородная суспензия.

4. Центрифугировать 10 мин, 10000 gcf при +4 °С. После центрифугирования смесь разделится на нижнюю фазу (органическую), интерфазу и верхнюю фазу (водная).

Примечание: если центрифугирование проводить при комнатной температуре, то в конечном образце возможна примесь ДНК, в данном случае необходима обработка ДНКазой.

5. Аккуратно перенести водную фазу, содержащую РНК, (примерно половина общего объёма) в чистую пробирку. Не отбирать верхнюю фазу полностью, избегать захвата интерфазы и нижней фазы.

Примечание: рекомендуется отбирать верхнюю фазу в количестве 40-45% от общего объема.

6. Сохранить органическую фазу и интерфазу для выделения ДНК.

Протокол выделения РНК.

1. К водной фазе добавить равный объем изопропанола (охлажденного до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Перемешать, перевернув пробирку 2-3 раза.

Примечание: при выделении РНК из малого количества образца (менее $0.5\text{-}1\cdot 10^6$ клеток или 10 мг образца) для увеличения выхода и улучшения качества РНК к водной фазе рекомендуется добавить 3 М ацетат натрия до конечной концентрации 0.3 - 0.6 М и/или 5-10 мкг гликогена, перемешать, затем добавить изопропанол.

2. Инкубировать 10 мин, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. Центрифугировать 10 мин, 12000 gcf при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4. Слить супернатант, сбросить капли на центрифуге, аккуратно отобрать остатки супернатанта пипеткой.

5. К осадку добавить 70-80% этанол (охлажденный до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) в количестве 1-1.5 объема от объема водной фазы. Перемешать, аккуратно перевернув пробирку 1-2 раза, чтобы ополоснуть стенки пробирки.

Примечание: на данной стадии возможно приостановить эксперимент. Осадок РНК в 70-80% этаноле может храниться несколько месяцев при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6. Центрифугировать 5 мин, 12000 gcf при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7. Слить супернатант, сбросить капли на центрифуге, аккуратно отобрать остатки супернатанта пипеткой.

Примечание: при выделении РНК из малого количества образца можно провести дополнительную промывку 70-80% этанолом.

8. Сушить осадок на воздухе 10-15 мин.

Важно: не пересушивать осадок, иначе может снизиться растворимость РНК.

9. К осадку добавить 20-50 мкл воды, очищенной от РНКаз. Инкубировать 5-10 мин, затем перемешать на вортексе 3-5 с.

10. Раствор РНК хранить при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Анализ выделенной РНК.

Целостность выделенной РНК можно проверить с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле.

Количество выделенной РНК можно оценить с помощью УФ-спектрометрии.

Характерный максимум поглощения для РНК при $\lambda = 260$ нм.

Посчитать концентрацию РНК (мкг/мл) можно по следующей формуле:

$A_{260} \cdot \text{разбавление} \cdot 40$ мкг/мл.

Характерные соотношения оптической плотности $A_{260}/A_{280} \sim 1.7-2.0$, $A_{260}/230 \geq 1.9$.

Протокол выделения ДНК.

1. Аккуратно удалить остатки водной фазы (протокол выделения РНК и ДНК, п. 6).

Примечание: при отборе водной фазы важно оставить интерфазу в пробирке.

2. Суспендировать органическую фазу и интерфазу пипетированием.

Важно: если не суспендировать образец, то на следующем этапе может образоваться объёмный осадок, который будет сложно растворить. Наиболее актуально при выделении ДНК из большого количества образца и при наличии большой интерфазы.

3. Добавить 300 мкл 96-100% этанола на 1 мл реагента «Лира», использованного для лизиса.

4. Перемешать образец, переворачивая пробирку несколько раз.

5. Инкубировать 5 мин.

6. Центрифугировать 5 мин, 2000 gcf при +4 °С.

7. Аккуратно удалить супернатант.

8. К осадку добавить 1 мл 0.1 М цитрата натрия в 10% этаноле (рН 8.5) на 1 мл реагента «Лира», использованного для лизиса.

9. Суспендировать осадок. Инкубировать 30 мин, периодически перемешивая, переворачивая пробирку.

10. Центрифугировать 5 мин, 2000 gcf при +4 °С.

11. Аккуратно удалить супернатант.

12. Повторить п. 8-11 1 раз.

Примечание: при большом количестве ДНК (>200 мкг) повторить промывку цитратом натрия 2 раза.

13. К осадку добавить 1-1.5 мл 70-80% этанола на 1 мл реагента «Лири», использованного для лизиса.

14. Суспендировать осадок. Инкубировать 10-20 мин, периодически перемешивая, переворачивая пробирку.

Примечание: на данной стадии возможно приостановить эксперимент. Осадок ДНК в 70-80% этаноле может храниться несколько месяцев при +4 – -25 °С.

15. Центрифугировать 5 мин, 2000 gcf при +4 °С.

16. Аккуратно удалить супернатант пипеткой. Сбросить капли на центрифуге, аккуратно отобрать остатки супернатанта пипеткой.

17. Сушить осадок ДНК на воздухе 5-10 мин.

18. Добавить к осадку 50-100 мкл 8-50 мМ NaOH. Суспендировать осадок пипетированием.

Примечание: ДНК, выделенная реагентом «Лири» не растворима в воде или TE буфере (рН 7-8). Выделенная ДНК может плохо растворяться в 8 мМ NaOH (рН 11.9), в этом случае концентрацию можно увеличить до 50 мМ (рН 12.5). Для лучшего растворения ДНК раствор можно инкубировать 5 мин при 50 °С.

Важно: геномная ДНК, растворённая в 50 мМ NaOH может быть денатурирована.

19. Довести рН раствора ДНК до 7-8 раствором HEPES (0.1-1 М).

Примечание: ДНК в NaOH рекомендуется хранить не более суток при +4 °С. Для длительного хранения ДНК при -20 °С необходимо нейтрализовать раствор ДНК раствором HEPES.

Анализ выделенной ДНК.

Целостность выделенной ДНК можно проверить с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле.

Количество выделенной ДНК можно оценить с помощью УФ-спектрометрии.

Характерный максимум поглощения для ДНК при $\lambda = 260$ нм.

Посчитать концентрацию ДНК (мкг/мл) можно по следующей формуле:



A_{260} * разбавление * 50 мкг/мл.

Характерные соотношения оптической плотности $A_{260}/A_{280} \sim 1.7-2.0$, $A_{260}/230 \geq 1.9$.

ООО «Биолабмикс»
630090 г. Новосибирск,
Ул., Инженерная, 28
Т/ф (383) 363-51-91
<http://www.biolabmix.ru>