

Информация о продукте

Реагент «ЛИРА» для выделения РНК, ДНК и белков (LR-100, LR-200)

Описание продукта

Реагент предназначен для выделения РНК, ДНК и белков из различных биологических образцов (эукариотических и бактериальных клеток, тканей животных и 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 и интерфазы при помощи этанола. Белки осаждаются из фенол-этанольного супернатанта изопропанолом.

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

- Выделенная РНК может быть использована для ОТ-ПЦР, нозерн-блота и других работ.
- Выделенная ДНК может быть использована для ПЦР, саузерн-блота и других работ.
- Выделенный белок может быть использован для вестерн-блота и других работ.

Меры предосторожности

Осторожно! Реагент «Лира» 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, ДНК и белков

Центрифуга способная достигать скорости не менее 12000 g и температуры + 4 °C
Нагревательный блок, поддерживающий температуру до 50 °C.

Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки

Хлороформ

PBS. *Необязательно*

Реагенты для выделения РНК

Изопропанол

Этанол, 70-80% раствор

Вода, очищенная от РНКаз

Ацетат натрия, 3 М раствор. *Необязательно*

Гликоген. *Необязательно*

Реагенты для выделения ДНК

Этанол, 95% раствор

Этанол, 70-80% раствор

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

8-50 мМ NaOH

0.1-1 М HEPES

Реагенты для выделения белка

Изопропанол

Этанол, 95% раствор

0.3 М гидрохлорид гуанидина в 95% EtOH

1% ратвор додецилсульфата натрия (ДСН)

Протокол выделения РНК, ДНК и белков

Все стадии выделения проводить при 15-25 °С, если не оговорено особо.

Подготовка образца

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

1а. Клеточная суспензия.

1.1а. Осадить клетки на центрифуге, удалить супернатант. Суспендировать клеточную суспензию в 10-100 мкл PBS.

1.2а. Лизировать клеточную суспензию в реагенте «Лира» в течение 10 мин. Выделение проводить в расчёте 1 мл «Лиры» на $5 \cdot 10^6$ эукариотических клеток или $1 \cdot 10^7$ бактериальных клеток. Объём «Лиры» должен быть не менее чем в 10 раз больше объёма суспензии.

1б. Клеточный монослой.

1.1б. Удалить среду. К клеточному монослою добавить реагент «Лира» в количестве достаточном, чтобы покрыть всю площадь (ориентировочно 1 мл «Лиры» на 10 см^2). Провести лизис клеток в течение 10 мин.

1.2б. Тщательно перемешать лизат пипетированием несколько раз. Перенести образец в чистую пробирку.

1в. Ткани животных и растений

1.1а. Гомогенизировать образец в реагенте «Лира» до получения однородной смеси. После гомогенизации инкубировать образец 10 мин. При гомогенизации реагент должен полностью покрывать образец. Выделение проводить в расчёте 1 мл «Лиры» на 50-100 мг образца. Если гомогенизация проводится на автоматическом гомогенизаторе рекомендуется охлаждать образец на льду между циклами гомогенизации, а также перед тем как приступить к следующей стадии протокола.

Стоп: на данной стадии возможно приостановить эксперимент. Лизат можно хранить при $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ не менее недели, если работу планируется продолжить в течение суток, образец можно хранить при $+4 \text{ }^\circ\text{C}$.

2. Необязательно. Для лучшей очистки образца РНК от ДНК рекомендуется центрифугировать лизат 10 мин, 10000-12000 g при $+4 \text{ }^\circ\text{C}$. При этом осадок будет содержать внеклеточные мембраны, полисахариды, высокомолекулярную ДНК, супернатант – РНК и белки.

Примечание: для выделения высокомолекулярной ДНК из осадка его необходимо суспендировать пипетированием либо в цитрате натрия (см. раздел «Выделение ДНК», п. 8), либо в новой порции реагента «Лира». В последнем случае выделение ДНК проводить по стандартному протоколу (см. раздел «Разделение фаз»). Данный пункт протокола не актуален при выделении из малых количеств образца (менее $1 \cdot 10^6$ клеток или 10 мг тканей), поскольку осадок не виден и плохо держится на стенках пробирки.

Важно: объёмный осадок ДНК сложно суспендировать в цитрате натрия (см. раздел «Выделение ДНК», п. 8), поэтому рекомендуется суспендировать осадок в реагенте «Лира».

Примечание: при объёме реагента «Лира» менее 500 мкл могут возникнуть проблемы при отборе водной фазы на следующей стадии из-за её небольшого размера. Избыток реагента «Лира» не приводит к снижению выхода РНК, ДНК и белков.

Разделение фаз

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

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

4. Энергично встряхнуть пробирку в течение 15 с. Инкубировать 5-10 мин, периодически перемешивая вручную. При перемешивании должна образоваться однородная суспензия.

5. Центрифугировать 10 мин, 10000 г 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 обязательно необходима обработка ДНКазой.

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

7. Сохранить органическую фазу и интерфазу для выделения ДНК и белков (см. раздел выделение ДНК).

Выделение РНК

1. К водной фазе (см. раздел «Разделение фаз», п. 6) добавить равный объём изопропанола. Перемешать, перевернув пробирку 2-3 раза.

Примечание: при выделении РНК из малого количества образца (менее $1 \cdot 10^6$ клеток или 10 мг тканей) 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 10-20 мкг гликогена (5-20 мкг/мкл), перемешать, затем добавить изопропанол.

2. Инкубировать 10 мин, -20 °С.

3. Центрифугировать 10 мин, 12000 g при +4 °С.
4. Слить супернатант, сбросить капли на центрифуге, аккуратно отобрать остатки супернатанта пипеткой.
5. К осадку добавить 1 мл 70-80% этанола. Перемешать, аккуратно перевернув пробирку 1-2 раза, чтобы ополоснуть стенки пробирки.
Стоп: на данной стадии возможно приостановить эксперимент. Осадок РНК в 70-80% этаноле может храниться не менее 6 месяцев при -20 °С.
6. Центрифугировать 5 мин, 12000 g при +4 °С.
7. Аккуратно удалить супернатант (**важно:** не задевать осадок), сбросить капли на центрифуге, удалить остатки супернатанта пипеткой.
Примечание: при выделении РНК из малого количества образца можно провести дополнительную промывку 70-80% этанолом для лучшей
8. Сушить осадок на воздухе 10-15 мин.
Важно: не пересушивать осадок, иначе может снизиться растворимость РНК.
9. К осадку добавить 30-100 мкл воды, очищенной от РНКаз. Инкубировать 5-10 мин, затем перемешать на вортексе 3-5 с.
10. Раствор РНК хранить при -20 °С.

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:

$A_{260} \cdot \text{разбавление} \cdot 40 \text{ мкг/мл} / \text{длина оптического пути (см)}$

Обычно длина оптического пути 1 см.

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

Выделение ДНК

1. Аккуратно удалить остатки водной фазы (см. раздел «Разделение фаз», п. 7).

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

2. Суспендировать органическую фазу и интерфазу пипетированием (по возможности до получения однородной смеси).

Важно: если образец не суспендировать достаточно хорошо, то на следующем этапе может образоваться плотный осадок ДНК, который будет сложно растворить. Наиболее актуально при выделении ДНК из большого количества

образца (более $1-2 \cdot 10^6$ клеток, 10-20 мг тканей) и при наличии объёмной 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 g при +4 °C.
 7. Аккуратно удалить супернатант. Сохранить супернатант для выделения белков (см. раздел «Выделение белков»).
 8. К осадку добавить 1 мл 0.1 М цитрата натрия в 10% этаноле (pH 8.5) на 1 мл реагента «Лира», использованного для лизиса.
- Стоп:** ДНК может храниться в данном растворе цитрата натрия не менее 2 ч.
9. Суспендировать осадок. Инкубировать не менее 30 мин, периодически перемешивая, переворачивая пробирку.
 10. Центрифугировать 5 мин, 2000 g при +4 °C.
 11. Аккуратно удалить супернатант.
 12. Повторить п. 8-11 один раз.

Примечание: при большом количестве ДНК (>200 мкг) повторить промывку цитратом натрия (п. 8-11) 2 раза.

13. К осадку добавить 1-1.5 мл 70-80% этанола на 1 мл реагента «Лира», использованного для лизиса.
14. Суспендировать осадок. Инкубировать 20 мин, периодически перемешивая, переворачивая пробирку.

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

15. Центрифугировать 5 мин, 2000 g при +4 °C.
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 50-600 мкл 8-50 мМ NaOH. Суспендировать осадок пипетированием.

Примечание: ДНК, выделенная реагентом «Лира» не растворима в воде или TE буфере (pH 7-8). Выделенная ДНК может плохо растворяться в 8 мМ NaOH (pH 11.9), в этом случае концентрацию можно увеличить до 50 мМ (pH 12.5). Для лучшего растворения ДНК инкубировать раствор 10 мин при 50 °C.

19. Довести pH раствора ДНК до значения 7-8 раствором 0.1-1 М HEPES.

Примечание: образец ДНК в 50 мМ NaOH рекомендуется нейтрализовать раствором HEPES в течение 30-60 мин после растворения. Образец ДНК в 8 мМ NaOH рекомендуется хранить не более суток при +4 °С. Для длительного хранения ДНК, нейтрализованную раствором HEPES, поместить на -20 °С. Для лучшей сохранности ДНК можно добавить раствор EDTA (рН 8) до конечной концентрации 1 мМ.

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:

$A_{260} \cdot \text{разбавление} \cdot 50 \text{ мкг/мл} / \text{длина оптического пути (см)}$

Обычно длина оптического пути 1 см.

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

Выделение белков

1. К супернатанту из раздела «Выделение ДНК», п. 7 добавить 1.5 мл изопропанола на 1 мл реагента «Лира», использованного для лизиса образца.
2. Инкубировать 10 мин.
3. Центрифугировать 10 мин, 12000 g при +4 °С.
4. Удалить супернатант пипеткой.
5. Суспендировать осадок в 2 мл 0.3 М гидрохлорида гуанидина в 95% этаноле на 1 мл реагента «Лира», использованного для лизиса образца (по возможности до получения однородной смеси).

Примечание: осадок можно аккуратно растереть наконечником пипетки.

6. Инкубировать 20 мин.

Стоп: белки могут храниться в растворе гидрохлорида гуанидина не менее 1 месяца при +4 °С, не менее года при -20 °С.

7. Центрифугировать 5 мин, 7500 g, +4 °С.
8. Удалить супернатант пипеткой.
9. Повторить п. 5-8 два раза.
10. Добавить 2 мл 95% этанола, перемешать на вортексе или пипеткой.
11. Инкубировать 20 мин.
12. Центрифугировать 5 мин, 7500 g, +4 °С.

13. Удалить супернатант пипеткой.
14. Сушить осадок на воздухе 5-10 мин.
15. Суспендировать осадок пипетированием в 100-600 мкл 1% ДСН.

Примечание: аккуратно перемешивать осадок, чтобы избежать пенообразования. Для лучшего растворения белков инкубировать раствор 10 мин при 50 °С.

16. Центрифугировать 10 мин, 12000 г при +4 °С, чтобы удалить не растворившиеся частицы.
17. Перенести супернатант в чистую пробирку.
18. Раствор белков хранить при -20 °С.

Анализ выделенных белков.

Качественно проанализировать смесь выделенных белков можно с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле.

Количество выделенных белков можно оценить с помощью УФ-спектрометрии.

Характерный максимум поглощения для белков при $\lambda = 280$ нм. Основной вклад в поглощение на длине волны 280 нм вносят ароматические аминокислоты, такие как фенилаланин, триптофан, тирозин.

Оценить концентрацию белков (мг/мл) можно по следующей формуле:

$A_{280} \cdot \text{разбавление} / \text{длина оптического пути (см)}$

Обычно длина оптического пути 1 см.

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