

## Информация о продукте

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

**Набор «Ли́ра+» для выделения РНК и ДНК (LRP-100-2)**

**Набор «Ли́ра+» для выделения РНК, ДНК и белков (LRP-100-3)**

### **Важно!**

Мы постоянно совершенствуем протокол работы с реагентом, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с продуктом.

Протокол обновлён 05.08.2022.

### **Описание продукта**

Реагент «Ли́ра» 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 «Ли́ра».

- 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.

### **Важно!**

Отличие набора «Ли́ра+» (кат. № LRP-100-2, LRP-100-3) от реагента «Ли́ра» (кат. № LR-100, LR-200) заключается в расширенной комплектации набора «Ли́ра+», включающего, помимо 100 мл реагента «Ли́ра», большинство необходимых реагентов для выделения РНК, ДНК и белков. Раствор для осаждения РНК позволяет выделять РНК из менее чем 10.000 клеток.



Биолабмикс®

### **Меры предосторожности**

Осторожно! Реагент «Ли́ра» 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.

Работу с реагентом «Ли́ра» необходимо проводить в вытяжном шкафу.

### **Условия хранения**

Все реагенты, входящие в состав набора, могут храниться не менее 1 года при комнатной температуре (15-25 °С).

Реагент «Ли́ра» и раствор для осаждения РНК хранится не менее 1 года при 2-8 °С.

### **Условия транспортировки**

Набор «Ли́ра+» (кат. № LRP-100-2, LRP-100-3), включая входящие в состав набора реагенты, и реагент «Ли́ра» (кат. № LR-100, LR-200) можно перевозить при комнатной температуре (15-25 °С) в течение 14 суток.

### **Объём реагента «Ли́ра»**

Кат. №	Объём
LR-100	100 мл
LR-200	2x100 мл
LRP-100-2	100 мл
LRP-100-3	100 мл

**Реагенты, входящие в состав набора «Лира+» (LRP-100-2, LRP-100-3)**

Название	Количество	LRP-100-2	LRP-100-3
<b>Реагенты для выделения РНК, ДНК и белков</b>			
Реагент «ЛИРА»	100 мл	+	+
PBS	10 мл	+	+
<b>Реагенты для выделения РНК</b>			
Ацетат натрия, 3 М раствор	10 мл	+	+
Раствор для осаждения РНК**	7 мл	+	+
Вода, очищенная от РНКаз*	10 мл	+	+
<b>Реагенты для выделения ДНК</b>			
1 М цитрат натрия (концентрат)	50 мл	+	+
2 М NaOH (концентрат)	1.5 мл	+	+
1 М HEPES	5 мл	+	+
<b>Реагенты для выделения белков</b>			
Гидрохлорид гуанидина (сухой)	12x1.5г	-	+
Додецилсульфат натрия (ДСН) (сухой)	2x0.5 г	-	+

\*Вода предназначена для растворения выделенной РНК. Вода для приготовления буферов в набор не включена.

\*\*Если в растворе для осаждения РНК при хранении при +4 °С образовался осадок, инкубировать раствор при 30-40 °С до растворения осадка.

**Материалы и оборудование необходимые для работы**
**Набор «Лира+» (LRP-100-2, LRP-100-3)**

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

Нагревательный блок, поддерживающий температуру до 50 °С

Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки

Вода (для приготовления растворов цитрата натрия, гидроксида натрия, ДСН)

Хлороформ

Этанол, 95% раствор

Изопропанол



Биолабмикс®

## Материалы и оборудование необходимые для работы

### Реагент «Лира» (LR-100, LR-200)

Материалы 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*

Лизоцим. *Необязательно*. Для выделения РНК, ДНК или белков из грамположительных бактерий\*

### 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% раствор додецилсульфата натрия (ДСН)

**Перед началом работы:**

**Реагент «Ли́ра» (LR-100, LR-200), наборы «Ли́ра+» (LRP-100-2, LRP-100-3)**

Если планируется выделять РНК из грамположительных бактерий, приготовить раствор лизоцима с концентрацией 50 мг/мл в ТЕ буфере (0.01 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.001 M EDTA).

**Наборы «Ли́ра+» (LRP-100-2, LRP-100-3)**

- Приготовить 80% этанол. Для приготовления 50 мл смешать 40 мл 95-96% этанола и 10 мл воды (не входит в набор).

**Перед началом работы приготовить следующие растворы для выделения ДНК:**

- Приготовить 0.1 M цитрат натрия в 10% этаноле (pH 8.5). Для приготовления 50 мл смешать 5 мл цитрата натрия (водный раствор, концентрат), 40 мл воды (не входит в набор), 5 мл 95% этанола.
- Приготовить 40 mM раствор NaOH. Для приготовления 5 мл смешать 100 мкл 2 M NaOH и 4.9 мл воды (не входит в набор). Хранить полученный раствор не более двух недель при 15-25 °C.
- Приготовить 8 mM раствор NaOH. Для приготовления 5 мл смешать 20 мкл 2 M NaOH и 5 мл воды (не входит в набор). Хранить полученный раствор не более двух недель при 15-25 °C.
- Для снижения значения pH до ~8 к 1 мл 40 mM NaOH добавить 50 мкл 1 M HEPES, к 1 мл 8 mM NaOH добавить 8 мкл 1 M HEPES.

**Примечание:** NaOH с концентрацией 40 mM и менее хранить не более 1 недели.

**Перед началом работы приготовить следующие растворы для выделения белков:**

- Приготовить 0.3 M гидрохлорид гуанидина в 95% этаноле. Для приготовления 50 мл к навеске гидрохлорида гуанидина (1.5 г) добавить 95% этанол до общего объема 50 мл.
- Приготовить 10% раствор ДСН. Для приготовления 5 мл к навеске ДСН (0.5 мг) добавить воду (не входит в набор), до общего объема 5 мл, тщательно перемешать на вортексе. После того, как осядет пена, убедиться, что объем раствора не менее 5 мл. Рекомендуется готовить раствор ДСН не менее чем за день до эксперимента, чтобы произошло осаждение пены. Раствор хранить не более 6 месяцев при 15 - 25 °C.
- Приготовить 1% раствор ДСН. Для приготовления 1 мл к 100 мкл 10% ДСН добавить 900 мкл воды (не входит в набор), аккуратно перемешать, избегая пенообразования.



## 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.

**Важно:** при выделении ДНК из грамположительных бактерий добавить 30 мкл раствора лизоцима (50 мг/мл) в ТЕ буфере (0.01 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA, pH 8.0).

#### 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<sup>2</sup>). 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 °С не менее недели, если работу планируется продолжить в течение суток, образец можно хранить при +4 °С.

**2. Необязательно.** Для лучшей очистки образца РНК от ДНК рекомендуется центрифугировать лизат 10 мин, 10000-12000 г при +4 °С. 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



Биолабмикс®

- 3 М ацетат натрия до конечной концентрации 0.3 - 0.6 М и/или
- соосади́тель нуклеиновых кислот, например, **10-20 мкг гликогена** (5-20 мкг/мл) или **70 мкл раствора для осаждения РНК**, входящего, в наборы LRP-100-2, LRP-100-3.

перемешать, затем добавить изопропанол.

2. Инкубировать 10 мин.

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.

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 г при +4 °С.

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 (рН 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 г при +4 °С.

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 °С.

15. Центрифугировать 5 мин, 2000 г 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 50-600 мкл 8-40 мМ NaOH. Суспендировать осадок пипетированием.

**Примечание:** ДНК, выделенная реагентом «Лира» не растворима в воде или TE буфере (рН 7-8). Если ДНК плохо растворяется в 8 мМ NaOH, увеличить объём или концентрацию NaOH (не более 40 мМ). Если ДНК растворилась, но получившийся раствор вязкий, увеличить объём NaOH. Для лучшего растворения ДНК инкубировать раствор 10 мин при 50 °С.



19. Довести pH раствора ДНК до значения 7-8 раствором 0.1-1 М HEPES. Для нейтрализации 1 мл раствора 40 мМ NaOH использовать 50 мкл 1 М HEPES, 20 мМ – 25 мкл 1 М HEPES, 8 мМ – 8 мкл 1 М HEPES.

**Примечание:** образец ДНК в 40 мМ NaOH рекомендуется нейтрализовать раствором HEPES сразу 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 (pH 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 g 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 +7 (383) 363-51-91  
<http://www.biolabmix.ru>