



Общество с ограниченной ответственностью
«Биолабмикс»
ИНН 5408278957 КПП 540801001
630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,
ул. Инженерная, дом № 28
Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40
E-mail: sales@biolabmix.ru

Реагент «Ли́ра»/Набор «Ли́ра+»

Реагент «Ли́ра Кариб»

Выделение РНК, ДНК и белков

Руководство пользователя

Кат. номер
LR-100, LR-200
LRgr-100
LRP-100-2, LRP-100-3
LRP-100-N

Оглавление

Описание	3
Особенности.....	4
Состав. Реагент «Лира»	5
Состав. Реагент «Лира Кариб».....	5
Состав. Набор «Лира+».....	5
Меры предосторожности.....	5
Материалы и оборудование необходимые для работы	6
Перед началом работы:	8
Протокол выделения РНК, ДНК и белков.....	9
Подготовка и лизис образца	9
1) Культуры эукариотических клеток. Монослойные культуры. Суспензия клеток.	10
2) Культуры эукариотических клеток. Монослойные культуры. Культуральные планшеты.....	11
3) Культуры эукариотических клеток. Суспензионные культуры.	12
4) Культуры клеток бактерий. Грамотрицательные бактерии.	13
5) Культуры клеток бактерий. Грамположительные бактерии.	14
6) Ткани животных и растений	15
7.1) Биологические жидкости (цельная кровь, плазма, сыворотка, слюна и др.).....	17
7.2) Суспензия клеток в стабилизаторе РНК и других аналогичных реагентах	17
8) Лейкоциты.....	18
Опционально. Очистка лизата от ДНК.....	19
Разделение фаз.....	20
Выделение РНК	21
Анализ выделенной РНК.....	21
Выделение ДНК.....	22
Анализ выделенной ДНК	23
Выделение белков	25
Анализ выделенных белков.....	26
Дополнительные реагенты:	27
Условия хранения:	28
Условия транспортировки:	28

Реагент «Ли́ра»/Набор «Ли́ра+», Реагент «Ли́ра Ка́риб» для выделения РНК, ДНК и белков

Кат. номер LR-100, LR-200, LRP-100-2, LRP-100-3, LRP-100-N, LRgr-100

Важно!

Мы постоянно совершенствуем протокол работы с набором, поэтому просьба использовать протокол, идущий в комплекте с набором. Последняя версия протокола доступна на сайте компании ООО «Биолабмикс» (www.biolabmix.ru).

Наборы предназначены только для научно-исследовательских целей.

Протокол обновлён 28.10.2024.

Описание

Реагенты «Ли́ра» и «Ли́ра Ка́риб» предназначены для выделения РНК, ДНК и белков из различных биологических образцов

1. культуры эукариотических и бактериальных клеток, лейкоциты;
2. ткани животных и растений;
3. биологические жидкости (цельная кровь, плазма, сыворотка, слюна и др.);
4. суспензия клеток в стабилизаторе РНК (St-100) и других аналогичных реагентах.

Реагенты представляют собой раствор, содержащий смесь фенола и тиоцианата гуанидина. Реагенты лизируют 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 реагентами «Ли́ра» или «Ли́ра Ка́риб».

- 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.

Особенности

Реагент «Ли́ра» (Кат. номер LR-100, LR-200)

Реагент представляет собой прозрачный раствор.

Реагент «Ли́ра Кариб» (Кат. номер LRgr-100)

Реагент аналогичен по составу реагенту «Ли́ра». Дополнительно содержит в составе зелёный краситель. Цвет конечного раствора может варьироваться от зелёного до голубого.

- Краситель не оказывает влияния на сохранность РНК в процессе выделения.
- При разделении фаз данный краситель полностью переходит в фенольную фазу, что может помочь при отборе водной фазы.
- При выделении ДНК и белков краситель не выпадает в осадок и переходит в супернатант, который удаляется в процессе выделения.

Набор «Ли́ра+» (Кат. номер LRP-100-2)

Набор содержит реагент «Ли́ра» и дополнительные растворы реагентов необходимые при выделении РНК и ДНК.

Набор «Ли́ра+» (Кат. номер LRP-100-3)

Набор содержит реагент «Ли́ра» и дополнительные растворы реагентов необходимые при выделении РНК, ДНК и белков.

Набор «Ли́ра+» (Кат. номер LRP-100-N)

Набор НЕ содержит реагент «Ли́ра». Набор содержит только дополнительные растворы реагентов необходимые при выделении РНК, ДНК и белков.

Важно! Для работы с набором необходимы реагент «Ли́ра» (кат. № LR-100, LR-200), или реагент «Ли́ра Кариб» (кат. № LRgr-100), или аналогичные фенол-гуанидиновые реагенты, протестированные для выделения РНК, ДНК и белков

Состав. Реагент «Ли́ра»

Кат. номер	LR-100	LR-200
Реагент «Ли́ра»	100 мл	2x100мл

Состав. Реагент «Ли́ра Кариб»

Кат. номер	LRgr-100
Реагент «Ли́ра Кариб»	100 мл

Состав. Набор «Ли́ра+»

Название	Количество	LRP-100-2	LRP-100-3	LRP-100-N
Реагенты для выделения РНК, ДНК и белков				
Реагент «Ли́ра»	100 мл	ДА	ДА	НЕТ
PBS	10 мл	ДА	ДА	ДА
Реагенты для выделения РНК				
Ацетат натрия, 3 М раствор	10 мл	ДА	ДА	ДА
Раствор для осаждения РНК*	7 мл	ДА	ДА	ДА
Вода, очищенная от РНКаз**	10 мл	ДА	ДА	ДА
Реагенты для выделения ДНК				
1 М цитрат натрия (концентрат)	50 мл	ДА	ДА	ДА
2 М NaOH (концентрат)	1.5 мл	ДА	ДА	ДА
1 М HEPES	5 мл	ДА	ДА	ДА
Реагенты для выделения белков				
Гидрохлорид гуанидина, 8 М раствор (концентрат)	30 мл	НЕТ	ДА	ДА
Додецилсульфат натрия (ДСН), 20% раствор (концентрат)	5 мл	НЕТ	ДА	ДА
Пробирки (50 мл) для подготовки 0.3 М гидрохлорида гуанидина в 95% этанол	12 шт.	НЕТ	ДА	НЕТ

*Если в растворе для осаждения РНК при хранении при +4 °С образовался осадок, инкубировать раствор при 20–40 °С до растворения осадка.

**Вода предназначена для растворения выделенной РНК. Вода для разбавления растворов цитрата натрия, гидроксида натрия, ДСН в набор не включена.

Меры предосторожности

Осторожно! Реагенты «Ли́ра» и «Ли́ра Кариб» содержат фенол и тиоцианат гуанидина, оказывающие раздражающее и токсичное действие. При работе необходимо соблюдать правила общей и личной техники безопасности. Токсичен при попадании на кожу и внутрь. Вызывает ожоги.

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

Работу с реагентами «Ли́ра» и «Ли́ра Кариб» необходимо проводить в вытяжном шкафу.

Материалы и оборудование необходимые для работы

1) Реагент «Ли́ра» (кат. № LR-100, LR-200)

Реагент «Ли́ра Кариб» (кат. № LRgr-100).

Материалы и оборудование для выделения РНК, ДНК и белков

- Центрифуга способная достигать скорости не менее 12000 rcf и температуры + 4 °C
- Нагревательный блок, поддерживающий температуру до 50 °C
- Микропробирки на 1.5–2.0 мл
- Хлороформ
- Опционально. PBS
- Опционально. Лизоцим. Для выделения РНК, ДНК или белков из грамположительных бактерий

Реагенты для выделения РНК

- Изопропанол
- Этанол, 80% раствор
- Вода, очищенная от РНКаз*
- Опционально. Ацетат натрия, 3 М раствор. Для осаждения РНК
- Опционально. Гликоген, раствор. Для осаждения РНК

* Вода, очищенная от РНКаз, представлена в каталоге в виде позиции «Стерильная вода» (Кат. № SP010-05, SP010-50).

Реагенты для выделения ДНК

- Этанол, 95–100% раствор
- Этанол, 80% раствор
- Цитрат натрия 0.1 М раствор в 10% этаноле (рН 8.5)
- NaOH, 8 или 40 мМ раствор
- HEPES, 0.1 или 1 М раствор

Реагенты для выделения белков

- Изопропанол
- Этанол, 95–100% раствор
- Гидрохлорид гуанидина, 0.3 М раствор в 95% этаноле
- Додецилсульфат натрия (ДСН), 1% раствор

2) Набор «Ли́ра+» (кат. № LRP-100-2, LRP-100-3)

- Центрифуга способная достигать скорости не менее 12000 rcf и температуры + 4 °С
- Нагревательный блок, поддерживающий температуру до 50 °С
- Микропробирки на 1.5-2.0 мл
- Вода тип I или milliQ (для приготовления растворов цитрата натрия, гидроксида натрия, ДСН) *
- Хлороформ
- Этанол, 95-100% раствор
- Изопропанол

*Вода тип I представлена в каталоге в виде позиции «Деионизированная вода тип I» (Кат. № WI-50, WI-500)

3) Набор «Ли́ра+» (кат. № LRP-100-N)

- Реагент «Ли́ра» (кат. № LR-100, LR-200), или реагент «Ли́ра Кариб» (кат. № LRgr-100), или аналогичные фенол-гуанидиновые реагенты, протестированные для выделения РНК, ДНК и белков;
- Материалы и оборудование аналогичные п. 2 (кат. № LRP-100-2, LRP-100-3).

Перед началом работы:

Набор «Лири+» (LRP-100-2, LRP-100-3, LRP-100-N)

1) Перед началом работы приготовить следующие растворы для выделения РНК:

1. Приготовить 80% этанол. Для получения 50 мл смешать 40 мл 95-100% этанола и 10 мл воды (не входит в набор).

2) Перед началом работы приготовить следующие растворы для выделения ДНК:

1. Приготовить 0.1 М цитрат натрия в 10% этаноле (рН 8.5). Для получения 50 мл смешать 5 мл 1 М цитрата натрия (водный раствор, концентрат), 40 мл воды (не входит в набор), 5 мл 95-100% этанола.

2. Приготовить 40 мМ или 8 мМ NaOH. Разбавленный раствор хранить не более одной недели при 15-25 °С.

2.1. 40 мМ NaOH. Для получения 1000 мкл смешать 20 мкл 2 М NaOH и 900 мкл воды (не входит в набор).

2.2. 8 мМ NaOH. Для получения 1000 мкл смешать 4 мкл 2 М NaOH и 1000 мкл воды (не входит в набор).

Для снижения значения рН до ~8

- к 1000 мкл 40 мМ NaOH добавить 50 мкл 1 М HEPES;
- к 1000 мкл 8 мМ NaOH добавить 8 мкл 1 М HEPES.

3) Перед началом работы приготовить следующие растворы для выделения белков:

1. Приготовить 0.3 М раствор гидрохлорида гуанидина в этаноле. Для получения 50 мл в пробирку добавить 50 мл 95% этанола до метки «50 мл», затем добавить 2 мл 8 М гидрохлорида гуанидина. Плотно закрыть крышку и тщательно перемешать, переворачивая пробирку.

Примечание: пробирки для подготовки раствора 0.3 М гидрохлорида гуанидина входят только в состав набора LRP-100-3.

2. Приготовить 1% раствор ДСН. Для получения 1 мл к 50 мкл 20% ДСН добавить 950 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.

Внимание! Далее по тексту Реагент «Лира» (кат. № LR-100, LR-200), реагент «Лира Кариб» (кат. № LRgr-100), или аналогичные фенол-гуанидиновые реагенты будут именоваться как «лизирующий реагент».

Подготовка и лизис образца

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

- 1) Культуры эукариотических клеток. Монослойные культуры. Суспензия клеток.
1. Снять клетки с поверхности культурального пластика методом, используемым в лаборатории, или стандартным методом, рекомендуемым для данной культуры клеток.
2. Перенести образец суспензии клеток (не более $1 \cdot 10^7$ клеток) в одноразовую микропробирку.
3. Осадить клетки центрифугированием 3 мин, 1000 gcf. Аккуратно отобрать супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 50 мкл PBS.
4. Чистым одноразовым наконечником добавить 500–1000 мкл лизирующего реагента (Лири или Лири Кариб).
 - При использовании $1 \cdot 10^6$ и более клеток добавить 1000 мкл лизирующего реагента (Лири или Лири Кариб)
 - При использовании менее $1 \cdot 10^6$ достаточно 500 мкл лизирующего реагента (Лири или Лири Кариб).
 - При использовании менее 500 мкл лизирующего реагента (Лири или Лири Кариб) есть риск случайного смешивания фенольной и водной фаз при отборе из-за их малого объема. Избыток реагента не ухудшает выделение.
 - Объем лизирующего реагента (Лири или Лири Кариб) должен быть не менее чем в 10 раз больше объема суспензии.
5. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения однородной суспензии. Сбросить капли коротким центрифугированием.
6. Инкубировать 10 мин.
7. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

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) Культуры эукариотических клеток. Монослойные культуры. Культуральные планшеты.

Ориентировочно 1 мл лизирующего реагента (Лири или Лири Кариб) достаточно на 10 см². Реагент должен полностью покрывать дно культуральной посуды. При необходимости увеличить объём реагента.

При работе с 12-, 24- или 96-луночными планшетами или с культуральной посудой с аналогичной площадью ячейки допускается лизис непосредственно в лунке.

1. Удалить культуральную среду из лунки планшета

2. В лунку 12- или 24-луночного планшета добавить 500 мкл лизирующего реагента,

В лунку 96-луночного планшета добавить 100 мкл лизирующего реагента.

3. Инкубировать 10 минут.

4. Аккуратно, избегая пенообразования, перемешать содержимое лунки пипетированием, убедиться, что клетки открепилась от ячейки или дна культуральной посуды. При необходимости увеличить время инкубации.

5. Перенести образец в чистую пробирку. Добавить дополнительную аликвоту лизирующего реагента к образцам, если требуется.

- При использовании $1 \cdot 10^6$ и более клеток добавить лизирующего реагента до общего объёма 1000 мкл.
- При использовании менее $1 \cdot 10^6$ добавить лизирующего реагента до общего объёма 500 мкл.
- При использовании менее 500 мкл лизирующего реагента есть риск случайного смешивания фенольной и водной фаз при отборе из-за их малого объёма. Избыток реагента не ухудшает выделение.

6. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

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.

3) Культуры эукариотических клеток. Суспензионные культуры.

1. Перенести образец суспензии клеток (не более $1 \cdot 10^7$ клеток) в одноразовую микропробирку.
2. Осадить клетки центрифугированием 3 мин, 1000 gcf. Аккуратно отобрать супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 50 мкл PBS.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 500–1000 мкл лизирующего реагента (Лири или Лири Кариб).
 - При использовании $1 \cdot 10^6$ и более клеток добавить 1000 мкл лизирующего реагента.
 - При использовании менее $1 \cdot 10^6$ достаточно 500 мкл лизирующего реагента.
 - При использовании менее 500 мкл лизирующего реагента есть риск случайного смешивания фенольной и водной фаз при отборе из-за их малого объема. Избыток реагента не ухудшает выделение.
 - Объем лизирующего реагента должен быть не менее чем в 10 раз больше объема суспензии.
4. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения гомогенной суспензии. Сбросить капли коротким центрифугированием.
5. Инкубировать 10 мин.
6. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

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 $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4) Культуры клеток бактерий. Грамотрицательные бактерии.

1. Перенести 0.5–2 мл суспензии ночной культуры клеток (не более $1 \cdot 10^8$ клеток) в одноразовую микропробирку.
2. Осадить клетки центрифугированием 1 мин, 10000 rcf. Аккуратно отобрать супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 50 мкл PBS.
3. Чистым одноразовым наконечником добавить 1000 мкл лизирующего реагента (Лира или Лира Кариб).
 - Объем лизирующего реагента должен быть не менее чем в 10 раз больше объема суспензии.
4. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения однородной суспензии. Сбросить капли коротким центрифугированием.
5. Инкубировать 10 мин.
6. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

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 $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5) Культуры клеток бактерий. Грамположительные бактерии.

Подготовка раствора лизоцима:

- Предварительно подготовить буфер для растворения лизоцима
 - 50 мМ Tris-HCl (pH 8), 10 мМ EDTA (pH 8), 50% глицерин
Примечание: в данном буфере раствор лизоцима возможно хранить не менее 6 месяцев при -20 °С.
 - 50 мМ Tris-HCl (pH 8), 10 мМ EDTA (pH 8)
Примечание: в данном буфере раствор лизоцима возможно хранить не более 1 недели при +4 °С.
- К навеске лизоцима чистым одноразовым наконечником добавить необходимый объём буфера для растворения лизоцима, чтобы получить раствор 50 мг/мл.
- Тщательно перемешать на вортексе.
- Инкубировать 30 мин при Tкомн (15-25 °С), периодически перемешивая до полного растворения лизоцима.

Примечание: лизоцим не входит в набор.

Подготовка и лизис бактерий:

1. Перенести 0.5–2 мл суспензии ночной культуры клеток (не более $1 \cdot 10^8$ клеток) в одноразовую микропробирку.
2. Осадить клетки центрифугированием 1 мин, 10000 gcf. Аккуратно отобрать супернатант.
3. Ресуспендировать осадок клеток в 50 мкл PBS пипетированием.
4. Чистым одноразовым наконечником добавить 30 мкл раствора лизоцима (50 мг/мл).
5. Перемешать образец на вортексе 5–10 с. Сбросить капли коротким центрифугированием. Инкубировать 10 мин при Tкомн (15–25°C).
6. Чистым одноразовым наконечником добавить 1000 мкл лизирующего реагента (Лира или Лира Кариб).
 - Объём лизирующего реагента должен быть не менее чем в 10 раз больше объёма суспензии.
7. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения гомогенной суспензии. Сбросить капли коротким центрифугированием.
8. Инкубировать 10 мин.
9. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

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.

6) Ткани животных и растений

Внимание! Сохранность РНК, ДНК и белков зависит от условий сбора и хранения образцов тканей. Для длительного хранения рекомендуется использовать Стабилизатор РНК (Кат. № St-100) и аналогичные реагенты, обеспечивающие сохранность РНК, ДНК и белков при длительном хранении.

Внимание! Рекомендуется использовать одноразовую систему гомогенизации либо провести полное удаление образца из системы гомогенизации после работы, чтобы избежать загрязнения последующих проб.

Внимание! Выход РНК, ДНК и белков сильно зависит от качества гомогенизации образца. Если возможно, рекомендуется добиться получения однородной суспензии образца.

- Гомогенизация с использованием жидкого азота

Внимание! При использовании данного метода гомогенизации лизирующего реагента (Лира или Лира Кариб) добавляется к образцу ткани после гомогенизации.

1. Поместить навеску образца ткани животных (10–100 мг) или ткани растений (50–100 мг) в чистую пробирку.
2. Тщательно измельчить образец в ступке с помощью одноразового пестика.
3. Перенести измельчённый образец в жидком азоте в одноразовую микропробирку на 1.5 мл.
4. Подождать, пока азот испарится, но не допускать того, чтобы ткань начала таять. Добавить 1000 мкл лизирующего реагента (Лира или Лира Кариб).
5. После гомогенизации инкубировать образец 10 мин.
6. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

- Гомогенизация с использованием механического гомогенизатора

1. Поместить навеску образца ткани животных (10–100 мг) или ткани растений (50–100 мг) в чистую пробирку.
2. К образцу ткани добавить 1000 мкл лизирующего реагента (Лира или Лира Кариб).
3. Провести гомогенизацию образца. Измельчить используя механический гомогенизатор тканей, например, FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals), TissueRuptor II (QIAGEN).

Примечание: рекомендуется охлаждать образец на льду между циклами гомогенизации.

4. После гомогенизации инкубировать образец 10 мин.
5. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

- Гомогенизация с использованием одноразовых пестиков для микропробирок

1. Поместить навеску образца ткани животных (10–100 мг) или ткани растений (50–100 мг) в чистую пробирку.
2. К образцу ткани добавить 500 мкл лизирующего реагента (Ли́ра или Ли́ра Кариб).
3. Тщательно перетереть образец пестиков.

Примечание: одноразовые, стерильные пестики представлена в каталоге (Кат. № pest-10).

4. После гомогенизации добавить дополнительно 500 мкл лизирующего реагента (Ли́ра или Ли́ра Кариб), инкубировать образец 10 мин.
5. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

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 $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.1) Биологические жидкости (цельная кровь, плазма, сыворотка, слюна и др.)

1. Поместить в чистую пробирку 100–200 мкл образца крови, плазмы, слюны, или другого образца.

Опционально. При наличии крупных примесей провести механическую гомогенизацию образца с использованием механического гомогенизатора или одноразовых пестиков (см. раздел (6) «Ткани животных и растений»).

2. Добавить 4 объёма лизирующего реагента (Лири или Лири Кариб) на 1 объём образца.

Пример. При объёме образца 100 мкл добавить 400 мкл лизирующего реагента, при объёме образца 200 мкл – 800 мкл лизирующего реагента.

3. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения гомогенной суспензии. Сбросить капли коротким центрифугированием.

4. Инкубировать 10 мин.

5. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

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 $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.2) Суспензия клеток в стабилизаторе РНК и других аналогичных реагентах

1. Поместить в чистую пробирку 100–200 мкл образца суспензии клеток в стабилизаторе РНК (St-100), других аналогичных реагентах, в физрастворе, PBS и др.

- Не использовать более $5\text{--}10 \cdot 10^6$ эукариотических клеток или $1\text{--}10 \cdot 10^7$ (или 0.5–2 мл ночной культуры) бактериальных клеток на 800 мкл лизирующего реагента (Лири или Лири Кариб).

2. Добавить 4 объёма лизирующего реагента (Лири или Лири Кариб) на 1 объём образца.

Пример. При объёме образца 100 мкл добавить 400 мкл лизирующего реагента, при объёме образца 200 мкл – 800 мкл лизирующего реагента.

3. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения гомогенной суспензии. Сбросить капли коротким центрифугированием.

4. Инкубировать 10 мин.

5. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

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 $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8) Лейкоциты

1. Подготовить осадок лейкоцитов, использовать не более 1–2 мл свежей крови.

Ресуспендировать осадок в 50 мкл PBS.

Важно! Для подготовки осадка лейкоцитов использовать только свежую незамороженную кровь. В зависимости от образца, условий транспортировки и других факторов образец крови можно хранить сутки при +4 °С.

Примечание: для подготовки осадка лейкоцитов можно использовать Буфер для лизиса эритроцитов RBC (Кат. № RBC-120, RBC-5x120, RBC-10x-50).

2. Чистым одноразовым наконечником добавить 1000 мкл лизирующего реагента (Ли́ра или Ли́ра Кариб) к суспензии лейкоцитов.

3. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе до получения гомогенной суспензии. Сбросить капли коротким центрифугированием.

4. Инкубировать 10 мин.

5. Далее перейдите к «Разделение фаз» или к «Опционально. Очистка лизата от ДНК».

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.

Опционально. Очистка лизата от ДНК

1. Центрифугировать лизат 10 мин, 12000 gcf при +4 °С.

Примечание: в осадке будет содержаться ДНК, в супернатанте – РНК и белки.

Примечание: при работе с тканями животных и растений осадок также будет содержать крупные фрагменты тканей.

Примечание: данная часть протокола может не дать значимого результата при выделении из малых количеств образца (менее $1 \cdot 10^6$ клеток или 1–10 мг тканей), поскольку осадок не виден и плохо держится на стенках пробирки.

2. Перенести супернатант в чистую пробирку. Далее перейдите к «Разделение фаз».

3. Для выделения ДНК из осадка его необходимо ресуспендировать пипетированием по одному из двух вариантов:

- в цитрате натрия, в таком случае перейдите к «Выделение ДНК»
- в новой аликвоте лизирующего реагента (Лира или Лира Кариб), в таком случае перейдите к «Разделение фаз»

Важно: объёмный осадок ДНК сложно ресуспендировать в цитрате натрия, поэтому рекомендуется ресуспендировать осадок лизирующем реагенте.

Разделение фаз

1. Добавить 1/5 объёма хлороформа от исходного объёма лизата (при работе с жидкими образцами) или лизирующего реагента (Лира или Лира Кариб), использованного для лизиса (при работе с осадками клеток и фрагментами тканей). Плотно закрыть крышку.

Пример. Например, добавить 200 мкл хлороформа на 1000 мкл лизата или лизирующего реагента.

Важно! Убедиться, что крышка закрыта плотно, иначе хлороформ может вытечь при переворачивании пробирки.

Примечание: избыток хлороформа не ухудшает разделение фаз.

2. Энергично встряхнуть пробирку в течение 15 с. Инкубировать 5 мин, периодически перемешивая вручную. При перемешивании должна образоваться однородная суспензия.
3. Центрифугировать 10 мин, 10000 g при +4 °C. После центрифугирования смесь разделится на нижнюю фазу (органическую), интерфазу и верхнюю фазу (водная).

Реагент «Лира». Водная и органическая фазы – прозрачные, интерфаза – белая.

Реагент «Лира Кариб». Водная фаза – прозрачная, органическая фаза – зелёная, интерфаза – белая.

Примечание: если центрифугирование проводить при комнатной температуре, то в конечном образце возможна примесь ДНК.

4. Аккуратно перенести водную фазу, содержащую РНК, в чистую пробирку.

Важно: не отбирать водную фазу полностью. Избегать захвата интерфазы и нижней фазы.

Примечание: объём отбираемой водной фазы должен быть не более 40% от общего объёма. Например, при объёме лизирующего реагента 1000 мкл, объёме хлороформа 200 мкл, рекомендуется отбирать водную фазу объёмом не более 400–500 мкл.

5. Сохранить органическую фазу и интерфазу для выделения ДНК и белков (см. раздел «Выделение ДНК»).

Примечание: сразу, после отбора водной фазы, тщательно удалить остатки водной фазы, иначе может произойти смешение фаз при длительной хранении и увеличение примеси РНК при последующем выделении ДНК.

Выделение РНК

1) Осаждение РНК

1. К водной фазе (см. раздел «Разделение фаз») добавить равный объём изопропанола. Тщательно перемешать пипетированием или на вортексе.

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;
- соосадитель 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 rcf при +4 °С.

4. Аккуратно отобрать супернатант, не задевая осадок.

2) Промывка осадка РНК

1. К осадку добавить 500–1000 мкл 80% этанола. Перемешать, аккуратно перевернув пробирку 1–2 раза, чтобы ополоснуть стенки пробирки.

Стоп: на данной стадии возможно приостановить эксперимент. Осадок РНК в 80% этаноле может храниться не менее 6 месяцев при –20 °С.

2. Центрифугировать 5 мин, 12000 rcf при +4 °С.

3. Аккуратно отобрать супернатант, не задевая осадок. Сбросить капли на центрифуге, удалить остатки супернатанта пипеткой.

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

4. Сушить осадок на воздухе 10–15 мин при 15–25 °С.

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

3) Растворение осадка РНК

1. К осадку добавить 30–100 мкл воды, очищенной от РНКаз. Инкубировать 5–10 мин, затем перемешать на вортексе 3–5 с. Сбросить капли на центрифуге.

2. 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 $A_{260}/A_{280} \sim 1.7\text{--}2.0$.

Выделение ДНК

1) Осаждение ДНК

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

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

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

Важно: если образец не ресуспендировать достаточно хорошо, то на следующем этапе может образоваться плотный осадок ДНК, который будет сложно растворить. Наиболее актуально при выделении ДНК из большого количества образца (например, более $1 \cdot 10^6$ клеток животных или 10 мг тканей) и при наличии объёмной интерфазы.

3. Добавить 300 мкл 95-100% этанола на 1 мл лизата (при работе с жидкими образцами) или лизирующего реагента (Ли́ра или Ли́ра Кариб), использованного для лизиса (при работе с осадками клеток и фрагментами тканей).

4. Перемешать образец, переворачивая пробирку несколько раз.

5. Инкубировать 5 мин.

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

7. Аккуратно удалить супернатант. Сохранить супернатант для выделения белков (см. раздел «Выделение белков»).

2) Промывка осадка ДНК

1. К осадку добавить 1 мл 0.1 М цитрата натрия в 10% этаноле (рН 8.5) на 1 мл лизата (при работе с жидкими образцами) или лизирующего реагента (Ли́ра или Ли́ра Кариб), использованного для лизиса (при работе с осадками клеток и фрагментами тканей).

Стоп: ДНК может храниться в данном растворе цитрата натрия не менее 2 ч.

2. Ресуспендировать осадок. Инкубировать не менее 30 мин, периодически перемешивая, переворачивая пробирку.

3. Центрифугировать 5 мин, 2000 rcf при +4 °С.

4. Аккуратно удалить супернатант.

5. Повторить п. 1-4 один раз.

Примечание: при большом количестве ДНК (>200 мкг) повторить промывку цитратом натрия (п. 1-4) 2 раза.

6. К осадку добавить 1-1.5 мл 80% этанола на 1 мл лизата (при работе с жидкими образцами) или лизирующего реагента (Ли́ра или Ли́ра Кариб), использованного для лизиса (при работе с осадками клеток и фрагментами тканей).

7. Ресуспендировать осадок. Инкубировать 20 мин, периодически перемешивая, переворачивая пробирку.

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

8. Центрифугировать 5 мин, 2000 rcf при +4 °.

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

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

3) Растворение осадка ДНК

1. Добавить к осадку 50-600 мкл 8-40 мМ NaOH. Ресуспендировать осадок пипетированием.

- ДНК, выделенная реагентом «Ли́ра» или «Ли́ра Кариб» 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.

2. После того, как осадок растворился, довести рН раствора ДНК до значения ~8 раствором 0.1-1 М HEPES.

- Для нейтрализации 1 мл раствора 40 мМ NaOH использовать 50 мкл 1 М HEPES.
- Для нейтрализации 1 мл раствора 20 мМ NaOH использовать 25 мкл 1 М HEPES.
- Для нейтрализации 1 мл раствора 8 мМ NaOH использовать 8 мкл 1 М HEPES.

Примечание: образец ДНК в 40 мМ NaOH рекомендуется нейтрализовать раствором HEPES сразу после растворения.

Примечание: образец ДНК в 8 мМ NaOH рекомендуется хранить не более суток при +4 °С.

Примечание: для длительного хранения ДНК, нейтрализованную раствором HEPES, поместить на -20 °С.

Примечание: для лучшей сохранности ДНК можно добавить раствор EDTA (рН 8) до конечной концентрации 1 мМ.

Важно! EDTA может ингибировать ферментативные реакции.

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 / 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) Осаждение белков

1. К супернатанту из раздела «Выделение ДНК» добавить 1.5 мл изопропанола на 1 мл лизата (при работе с жидкими образцами) или лизирующего реагента (Лири или Лири Кариб), использованного для лизиса (при работе с осадками клеток и фрагментами тканей). Перемешать пипетированием или на вортексе.
2. Инкубировать 10 мин.
3. Центрифугировать 10 мин, 12000 rcf при +4 °С.
4. Удалить супернатант пипеткой.

2) Промывка осадка белков

1. Ресуспендировать осадок в 2 мл 0.3 М гидрохлорида гуанидина в 95% этаноле на 1 мл лизата (при работе с жидкими образцами) или лизирующего реагента (Лири или Лири Кариб), использованного для лизиса (при работе с осадками клеток и фрагментами тканей).

Примечание: если возможно, получить однородную смесь, осадок можно аккуратно растереть наконечником пипетки.

2. Инкубировать 20 мин.

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

3. Центрифугировать 5 мин, 7500 rcf при +4 °С.
4. Удалить супернатант пипеткой.
5. Повторить п. 1-4 два раза.
6. Добавить 2 мл 95% этанола, перемешать пипетированием или на вортексе.
7. Инкубировать 20 мин.
8. Центрифугировать 5 мин, 7500 rcf при +4 °С.
9. Удалить супернатант пипеткой.
10. Сушить осадок на воздухе 5-10 мин.

3) Растворение осадка белков

1. Ресуспендировать 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.

2. Центрифугировать 10 мин, 12000 rcf при +4 °С, чтобы удалить не растворившиеся частицы.
3. Перенести супернатант в чистую пробирку.
4. Раствор белков хранить при -20°C.

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.

Дополнительные реагенты:

Реагенты для выделения НК

- Стерильные пестики для гомогенизации образцов тканей в микропробирках (Кат. № pest-10).
- Стабилизатор РНК (Кат. № St-100).
- Буфер для лизиса эритроцитов RBC (Кат. № RBC-120, RBC-5x120, RBC-10x-50).
- Набор для выделения суммарной РНК и микроРНК из реагента «Лири» (Кат. № LRU-100-50-N).

Реагенты для электрофореза

- Буферы для электрофореза в агарозном геле: трис-ацетатный буфер (Кат. № BE-DNA-500, BE-DNA-1000), трис-боратный буфер (Кат. № TBE-500).
- Раствор бромистого этидия (Кат. № EtBr-10) для визуализации НК.
- Буферы для внесения образцов ДНК и РНК в гель (Кат. № D-3001, D-3002, D-3003).
- Маркеры молекулярных весов ДНК (Кат. № S-8000, S-8100, S-8103, S-8055, S-8250, S-8150).
- Буфер для электрофореза в полиакриламидном геле (Кат. № BE=Prot-500, BE=Prot-1000).
- Буферы для внесения образцов белков в гель (Кат. № D-Prot-01, D-Prot-ME-01).
- Растворы для окрашивания белков в полиакриламидных гелях (Кат. № D-Solution-01, D-Solution-02).
- Маркеры молекулярной массы белков (Кат. № PS-2050, PS-2250, PS-1050, PS-1250)

Ферменты для выделения НК

- Термолabileзная ДНКаза, 2 ед/мкл (Кат. № EM-100, EM-250, EM-1250).
- Протеиназа К (Кат. № EP-1200).
- РНКаза А (Кат. № ER-500).

Растворы реагентов

- Раствор гидрохлорида гуанидина с концентрацией 8 М (Кат. № GuHCl-100).
- Раствор тиоцианата гуанидина с концентрацией 6 М (Кат. № GuSCN-100).
- ТЕ буфер, 1x, pH 8 (Кат. № TE-1x-100, TE-1x-500).
- ТЕ буфер, 10x, pH 8 (Кат. № TE-10x-10).
- Раствор Tris с концентрацией 1 М, pH 8.5 (Кат. № Tris-100-8.5).
- Раствор Tris с концентрацией 1 М, pH 7.5 (Кат. № Tris-100-7.5).
- Раствор EDTA с концентрацией 0.5 М, pH 8 (Кат. № EDTA-10).
- Раствор SDS (ДСН или додецилсульфат натрия) с концентрацией 20% (Кат. № SDS-10).
- Деионизированная вода тип I (Кат. № WI-50, WI-500).
- Стерильная вода (Кат. № SP010-05, SP010-50).

Условия хранения:

Реагенты набора «Лира+» хранить при комнатной температуре (15-25°C).

Реагент «Лира», реагент «Лира Кариб», раствор для осаждения РНК, 2 М NaOH (концентрат) хранить при 2-8 °С. Срок годности см. на упаковке.

Условия транспортировки:

Транспортировку набора «Лира+» (Кат. № LRP-100-2, LRP-100-3, LRP-100-N), включая все компоненты, и реагента «Лира» (Кат. № LR-100, LR-200) производить при температуре от +15 до +25 °С. Допускается транспортировка при температуре не выше +25 °С в течение 14 суток.

Транспортировку реагентов «Лира» (Кат. № LR-100, LR-200) и «Лира Кариб» (Кат. № LRgr-100) производить при температуре от +15 до +25 °С. Допускается транспортировка при температуре не выше +25 °С в течение 14 суток.

Продукция компании Биолабмикс

Наборы для
выделения
ДНК/РНК



Наборы и смеси
для ПЦР



ОТ и ОТ-ПЦР



Изотермическая
амплификация



ДНК-маркеры



Ферменты



Олиго-
нуклеотиды



Платформа
для синтеза
мРНК



Маркеры
молекулярной
массы белков



Host cell
DNA detection



Контрактное
производство

Собственные
разработки

sales@biolabmix.ru
8 800 600 88 76

www.biolabmix.ru



9001:2015
13485:2016



ПОДПИСЫВАЙТЕСЬ
НА НАШУ ГРУППУ ВК
vk.com/biolabmix



ЗАХОДИТЕ НА НАШ
ТЕЛЕГРАМ КАНАЛ
t.me/biolabmix