



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 «ЛИРА»/Набор «ЛИРА+» для выделения РНК, ДНК и белков

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

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 12.02.2024.

Описание

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 смесь фенола и тиоцианата гуанидина. 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 эффективно осаждать РНК, выделяемую из менее, чем 10.000 клеток.

Состав набора «Лира+» (Кат. номер LRP-100-2, LRP-100-3)

Название	Количество	LRP-100-2	LRP-100-3
Реагенты для выделения РНК, ДНК и белков			
Реагент «ЛИРА»	100 мл	+	+
PBS	10 мл	+	+
Реагенты для выделения РНК			
Ацетат натрия, 3 М раствор	10 мл	+	+
Раствор для осаждения РНК*	7 мл	+	+
Вода, очищенная от РНКаз*	10 мл	+	+
Реагенты для выделения ДНК			
1 М цитрат натрия (концентрат)	50 мл	+	+
2 М NaOH (концентрат)	1.5 мл	+	+
1 М HEPES	5 мл	+	+
Реагенты для выделения белков			
Гидрохлорид гуанидина, 8 М раствор (концентрат)	30 мл	-	+
Додецилсульфат натрия (ДСН), 20% раствор (концентрат)	5 мл	-	+

*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 приготовления буферов в набор не включена.

Меры предосторожности

Осторожно! Реагент «Лира» содержит 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 реагентом «Лира» необходимо проводить в вытяжном шкафу.

Материалы и оборудование необходимые для работы

1) Набор «Лира+» (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 (для приготовления растворов цитрата натрия, гидроксида натрия, ДСН)
- Хлороформ
- Этанол, 95-100% раствор
- Изопропанол

2) Реагент «Ли́ра» (LR-100, LR-200)

Материалы и оборудование для выделения РНК, ДНК и белков

- Центрифуга способная достигать скорости не менее 12000 gcf и температуры + 4 °С
- Нагревательный блок, поддерживающий температуру до 50 °С
- 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
- **Опционально.** Гликоген, раствор

Реагенты для выделения ДНК

- Этанол, 95–100% раствор
- Этанол, 80% раствор
- 0.1 М цитрат натрия в 10% этаноле (рН 8.5)
- NaOH, 8–50 мМ раствор
- HEPES, 0.1–1 М раствор

Реагенты для выделения белков

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

Перед началом работы:

1) 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 М Tris-HCl (рН 8.0), 0.001 М EDTA).

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

Приготовить 80% этанол. Для получения 50 мл смешать 40 мл 95–100% этанола и 10 мл воды (не входит в набор). Необходим для выделения РНК и ДНК.

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 NaOH. Для получения 5 мл смешать 100 мкл 2 М NaOH и 4.9 мл воды (не входит в набор). Хранить полученный раствор не более одной недели при 15–25 °С.
3. Приготовить 8 мМ NaOH. Для получения 5 мл смешать 20 мкл 2 М NaOH и 5 мл воды (не входит в набор). Хранить полученный раствор не более одной недели при 15–25 °С.
4. Для снижения значения pH 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.

Перед началом работы приготовить следующие растворы для выделения белков:

1. Приготовить 0.3 М раствор гидрохлорида гуанидина в этаноле. Пробирки для подготовки раствора 0.3 М гидрохлорида гуанидина входят в состав набора LRP-100-3.
Для получения 50 мл в пробирку добавить 50 мл 95% этанола до метки «50 мл», затем добавить 2 мл 8 М гидрохлорида гуанидина. Плотнo закрыть крышку и тщательно перемешать, переворачивая пробирку.
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.

Подготовка образца

Для выделения РНК, ДНК и белков 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.

1) Клеточная суспензия

1. Осадить клетки на центрифуге, удалить супернатант. Ресуспендировать осадок клеток в 50 мкл PBS.

Примечание: при выделении РНК из грамположительных бактерий добавить 30 мкл раствора лизоцима (50 мг/мл) в ТЕ буфере (0.01 М Tris-HCl, 0.001 М EDTA, pH 8.0). Инкубировать 10 мин при Tкомн (15–25 °С).

2. Чистым одноразовым наконечником добавить 500–1000 мкл реагента «Ли́ра», перемешать пипетированием или на вортексе, инкубировать 10 мин.

Примечание: 1000 мкл реагента «Ли́ра» при использовании более $1 \cdot 10^6$ эукариотических клеток или $1 \cdot 10^7$ бактериальных клеток, 500 мкл реагента «Ли́ра» при использовании менее $1 \cdot 10^6$ эукариотических клеток или $1 \cdot 10^7$

бактериальных клеток. Не использовать менее 500 мкл реагента «Ли́ра». Избыток реагента не ухудшает выделение.

Примечание: Объём реагента «Ли́ра» должен быть не менее чем в 10 раз больше объёма суспензии.

2) Клеточный монослой

1. Удалить среду. К клеточному монослою добавить реагент «Ли́ра» в количестве достаточном, чтобы покрыть всю площадь (ориентировочно 1 мл «Лиры» на 10 см²). Инкубировать 10 мин.
2. Тщательно перемешать лизат пипетированием. Перенести образец в чистую пробирку.

3) Ткани животных и растений

1. Гомогенизировать образец в реагенте «Ли́ра» до получения однородной смеси. После гомогенизации инкубировать образец 10 мин.

Примечание: использовать 1000 мкл «Лиры» на 50-100 мг образца.

Примечание: при гомогенизации реагент должен полностью покрывать образец. 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.

4) Опционально (очистка лизата от ДНК):

Для лучшей очистки образца РНК от ДНК рекомендуется центрифугировать лизат 10 мин, 12000 гcf при +4 °С. При этом осадок будет содержать ДНК, супернатант – РНК и белки.

Примечание: для выделения ДНК из осадка его необходимо ресуспендировать пипетированием либо в цитрате натрия (см. раздел «Выделение ДНК»), либо в новой порции реагента «Ли́ра». 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*10⁶ клеток или 10 мг тканей), поскольку осадок не виден и плохо держится на стенках пробирки.

Важно: объёмный осадок ДНК сложно ресуспендировать в цитрате натрия, поэтому рекомендуется ресуспендировать осадок в реагенте «Ли́ра».

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

Разделение фаз

1. Добавить 1/5 объёма хлороформа от исходного объёма «Лиры» (200 мкл хлороформа на 1000 мкл «Лиры»). Плотно закрыть крышку.
Важно: убедиться, что крышка закрыта плотно, иначе хлороформ может вытечь при переворачивании пробирки.
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 rcf 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.

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 реагента «Лира» 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»), тщательно удалив остатки водной фазы.

Выделение РНК

1. К водной фазе (см. раздел «Разделение фаз») 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;
- соосадитель нуклеиновых кислот, например, 10-20 мкг гликогена (5-20 мкг/мкл) 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.
5. 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.

6. Центрифугировать 5 мин, 12000 rcf при +4 °С.
7. 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.

8. Сушить осадок на воздухе 10-15 мин при 15-25 °С.

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. Сбросить капли на центрифуге.
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»).

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 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 $1 \cdot 10^6$ клеток, 10 мг тканей) и при наличии объёмной интерфазы.

3. Добавить 300 мкл 95–100% этанола на 1 мл реагента «Ли́ра», 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. 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 «Ли́ра», использованного для лизиса.

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

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

10. Центрифугировать 5 мин, 2000 gcf 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 80% этанола на 1 мл реагента «Ли́ра», использованного для лизиса.

14. Ресуспендировать 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 °.

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

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. Ресуспендировать осадок пипетированием.

Примечание: ДНК, выделенная реагентом «Ли́ра» 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 ~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. 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:

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

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» добавить 1.5 мл изопропанола на 1 мл реагента «Лира», использованного для лизиса образца. Перемешать пипетированием или на вортексе.
2. Инкубировать 10 мин.
3. Центрифугировать 10 мин, 12000 rcf при +4 °С.
4. Удалить супернатант пипеткой.
5. Ресуспендировать 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°C, не менее года при -20°C.
7. Центрифугировать 5 мин, 7500 rcf при +4 °С.
8. Удалить супернатант пипеткой.
9. Повторить п. 5–8 два раза.
10. Добавить 2 мл 95% этанола, перемешать пипетированием или на вортексе.
11. Инкубировать 20 мин.
12. Центрифугировать 5 мин, 7500 rcf при +4 °С.
13. Удалить супернатант пипеткой.
14. Сушить осадок на воздухе 5–10 мин.
15. 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.
16. Центрифугировать 10 мин, 12000 rcf при +4 °С, чтобы удалить не растворившиеся частицы.
17. Перенести супернатант в чистую пробирку.
18. 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:

- Стерильные пестики для гомогенизации образцов тканей в микропробирках (Кат. № pest-10).
- 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)
- Термолабильная ДНКаза, 2 ед/мкл (Кат. № EM-100, EM-250, EM-1250).
- Протеиназа К (Кат. № EP-1200).
- РНКаза А (Кат. № ER-500).

Условия хранения:

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

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

Условия транспортировки:

Транспортировку набора «Лира+» (Кат. № LRP-100-2, LRP-100-3), включая все компоненты, реагента «Лира» (LR-100, LR-200) 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 В ВК