

GRIZol Reagent (总 RNA 提取试剂)

产品名称	目录号	包装规格	价格 (元)
GRIZol Reagent	GR1011	50ml	160
	GR1012	100ml	320

适用范围:

适用于各种动植物组织/细胞总RNA、DNA、蛋白的快速抽提

产品储存:

GRIZol 在室温下能稳定保存12 个月。尽管如此为达到最佳效果,我们建议保存在2~8°C。

重要提示:

有毒物接触皮肤或者不慎吞服,会导致灼伤。一旦接触皮肤后立即以大量的洗涤剂和清水清洗。若感不适,看医生并寻求苯酚和其他成分的正确治疗方案。

产品介绍:

GRIZol 试剂是直接从事物或组织中抽取总 RNA 的试剂。它在破碎和溶解细胞时能保持 RNA 的完整性。加入氯仿后离心,样品分成水样层和有机层。RNA 存在于水样层中。收集上面的水样层后, RNA 可以通过异丙醇沉淀来还原。在除去水样层后,样品中的 DNA 和蛋白也能相继以沉淀的方式还原。乙醇沉淀能析出中间层的 DNA,在有机层中加入异丙醇能沉淀出蛋白。共纯化 DNA 对于样品间标准化 RNA 的产量十分有用。

无论是人动物植物还是细菌组织,该方法对少量的组织(50-100mg)和细胞(5×10^6)以及大量的组织($\geq 1g$)和细胞($> 10^7$)均有较好的分离效果。GRIZol 试剂操作上的简单性允许同时处理多个的样品。所有的操作可以在一小时内完成。GRIZol 抽提的总RNA 能够避免DNA 和蛋白的污染。故而能够作RNA 印迹分析、斑点杂交、poly(A)+选择、体外翻译、RNA 酶保护分析和分子克隆。如果是用于 PCR,当两条引物位于单一外显子内时,建议用扩增级的 DNase I 来处理抽提的总 RNA。

GRIZol 试剂能促进不同种属不同分子量大小的多种 RNA 的析出。例如,从大鼠肝脏抽提的 RNA 琼脂糖凝胶电泳并用溴化乙锭染色,可见许多介于 7 kb 和 15 kb 之间不连续的高分子量条带(mRNA 和 hnRNA 成分),两条优势核糖体~5 kb (28S)和~2 kb(18S),低分子量RNA 介于0.1 和0.3 kb 之间 (tRNA, 5S)。当抽提的RNA 用TE 稀释时其 A260/A280 比值 ≥ 1.8 。

注意事项:

1. 当 GRIZol 用量少于 2ml 时建议使用清洁的一次性的聚丙烯材质试管。
2. 当 GRIZol 用量较大时,可以使用玻璃试管(Corex)或聚丙烯材质试管,事先检验以确保该试管可以耐受加入 GRIZol 和氯仿后 12,000×g 的离心力。不可使用破损的试管。
3. 离心前小心平衡试管。
4. 离心前玻璃管口必须盖上铝箔并用石蜡膜封口,聚丙烯管必须盖紧。
5. 从少量的组织(1~10mg)或细胞($10^2 \sim 10^4$)中分离RNA 样品:往组织或细胞中加入

800 μ l GRIZol。待样品裂解后,加入氯仿并进行步骤2 中的抽提操作。在用异丙醇沉淀RNA 之前,加入5~10 μ g 无RNA 酶的glycogen 作为水样层的载体。为降低其黏度在加入氯仿前用26 号注射器抽吸两次以切断基因组DNA。Glycogen 会留在水样层中并和RNA 共析出。

在浓缩到4mg/ml之前它不会抑制逆转录反应第一链的合成也不会抑制PCR。

6. 在匀化后和加入氯仿之前样品可以在-60~-70°C保存至少一个月RNA沉淀步骤4, RNA漂洗)溶于75%的乙醇在2~8°C至少可以保存一周,在-5~-20°C下至少可保存一年。
7. 台式离心机最大能达到12,600×g的离心力,如果将离心时间延长到30~60分钟可以满足步骤2和步骤3中的操作。

RNA 抽提操作步骤:

用GRIZol抽提RNA时要戴手套和护眼罩。避免接触皮肤和衣服。在化学通风橱完成操作。避免呼吸道吸入。如无例外,所有的操作应该在在15~30°C的条件下。

实验所需试剂但未提供的物品:

1. 氯仿
2. 异丙醇
3. 75%乙醇(用DEPC处理过的水配制)
4. 无RNA酶的水或0.5% SDS溶液调配无RNA酶的水——将水加入无RNA酶的玻璃瓶中,加入DEPC至0.1% (v/v)。放置过夜并高压灭菌。SDS溶液必须用DEPC处理过并经高压灭菌的水配制。

1. 匀浆化作用

a. 组织用glass或强力匀浆器搅匀组织样品,每50~100mg组织加1ml的GRIZol。匀浆化时组织样品容积不能超过GRIZol容积的10%。

b. 单层生长的细胞

直接往直径3.5cm的培养板中加入1ml的GRIZol溶解细胞通过移液管分次移出细胞裂解物。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的GRIZol量(每10cm²加1ml)。当GRIZol量不足时可导致抽提的RNA中污染有DNA。

c. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞。在GRIZol试剂中用移液管反复吹打来裂解细胞。每

5~10×10⁶的动物细胞,植物或酵母菌细胞或每1×10⁷细菌加1ml的GRIZol。在加入GRIZol前应避免洗涤细胞,因为那样会增加mRNA降解的可能性。破裂某些酵母菌和细菌可能需要使用匀浆器。

可选方案:当样品富含蛋白质,脂肪,多糖或是细胞外物质例如肌肉,脂肪组织和植物的块茎部分时可能需要一额外的分离步骤。匀浆化后在2~8°C的条件下以12,000×g的离心力离心10分钟,移除匀浆中不溶解的物质,余下的沉淀中包含有细胞外膜,多糖,以及高分子量DNA,而上层的超浮游物含有RNA。在来自于脂肪组织的样品中,大量的脂肪漂在最上层因而应该除掉。在每一个个案中,将清亮的匀浆溶液转移到一干净的试管中加入氯仿并继续进行下述的分离步骤。

2. 分离阶段

将匀浆样品在15-30°C条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。每1ml GRIZol加0.2ml氯仿。盖紧样品管盖,用手用力摇晃试管15秒并将其在室温下孵育2~3分钟。在2~8°C下以不超过12,000×g的离心力高速冷冻离心15分钟。离心后混合物分成三层:下层苯酚-氯仿层,中间层,上层无色的水样层。RNA无一例外地存在于水样层当中。水样层的容量大约为所加GRIZol容量的60%。

3. RNA的沉淀将水样层转移到一干净的试管中,如果希望分离DNA和蛋白,有机层同样要予以保留。通过将水样层和异丙醇混合来沉淀RNA。最初均化时的每1ml GRIZol对应0.5ml异丙醇。将混合的样品在15-30°C条件下孵育10分钟并在2~8°C下以不超过12,000×g的离心力高速冷冻离心10分钟。RNA沉淀在离心前通常不可见,形成一胶状片

状沉淀附着于试管壁和管底。

4. **RNA 的漂洗**

移去上层悬液。用 75% 的乙醇洗涤 RNA 沉淀一次，每 1ml 的 GRIzol 至少加 1ml 的 75% 乙醇。旋涡振荡混合样品并在 2~8℃ 下以不超过 7,500×g 的离心力高速冷冻离心 5 分钟。

5. **RNA 的再溶解** 在操作的最后，简单干燥 RNA 沉淀（空气干燥或真空干燥 5~10 分钟）不要在真空

管里离心干燥 RNA。尤为重要，不能让 RNA 沉淀完全干燥那样会极大地降低它的可溶性。部分溶解的 RNA 样品其 A260/280 比值 < 1.6。用移液管尖分几次移取 无 RNA 酶的水或 0.5% SDS 溶液来溶解 RNA（当 RNA 以后要用于酶切反应时，避免使用 SDS）RNA 还能被 100% 甲酰胺（除去离子）再溶解并保存在 -70℃。