

# TsingZol Total RNA Extraction Reagent

## TsingZol 总RNA提取试剂

### ■ 目录号

TSP401

### ■ 产品简介

TsingZol Total RNA Extraction Reagent (以下简称“TsingZol Reagent”) 是基于异硫氰酸胍/酚的广谱型总RNA提取试剂, 具有极强的裂解能力, 广泛适用于次生代谢物较少的植物组织 (如幼苗、幼叶等)、培养细胞、动物组织、微生物。本产品可在短时间内裂解细胞和组织样本, 并有效抑制RNase活性, 保证RNA的完整性。提取过程可在1 h内完成, 提取的总RNA纯度高、完整性好, 最大限度的去除了蛋白质和基因组DNA等杂质, 可以直接用于RT-PCR、Northern Blot、体外翻译及mRNA纯化等实验。

### ■ 产品组成

组分	规格
TsingZol Total RNA Extraction Reagent	100 mL

01

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。

### ■ 产品特点

- 适用范围广;
- 操作简单快速, 整个过程可在1 h内完成;
- 操作可视, 溶液呈粉红色, 便于分离水相及有机相;
- 纯度高, 污染少。

### ■ 注意事项及准备

- 使用一次性塑料手套和口罩进行所有试剂配制和实验操作, 以避免RNase污染;
- 使用RNase-free的实验器具, 包括枪头和离心管, 并且RNA实验用的器具建议专门使用, 不要用于其它实验, 避免交叉污染;
- 应使用RNase-free的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在180°C烘烤4 h, 塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min, 然后用水彻底清洗, 再灭菌, 即可去除RNase。塑料和玻璃器皿也可通过固相RNase清除剂 (目录号: TSP005) 浸泡处理以去除RNase;
- 配制溶液应使用RNase-free水;
- 本产品含有苯酚等物质, 操作过程中应穿戴相应防护用品, 避免沾染皮肤、眼睛及衣物, 防止吸入。如不慎沾染皮肤或眼睛, 及时用大量清水或生理盐水冲洗, 必要时寻求医生帮助。

### ■ 操作步骤 (实验前请先阅读注意事项)

自备试剂: 氯仿、异丙醇、75%乙醇 (用RNase-free水配制)、RNase-free水。

#### 1. 样品准备

##### 1.1 动物/植物组织

- 1) 将新鲜组织用液氮速冻, 迅速转移至液氮预冷的研钵中, 用研杵研磨, 期间不断加入液氮, 直至研磨成粉末状 (无明显可见颗粒);

- 2) 将研磨至粉末状的样品转移到离心管中, 每50~100 mg样品加入1 mL TsingZol Reagent, 匀浆处理;

- 3) 室温静置5 min (使核酸蛋白复合物完全分离)。

**注: 样品体积一般不要超过TsingZol Reagent体积的10%, 如果TsingZol Reagent加量不足会导致提取的RNA中有DNA污染。**

#### 1.2 贴壁细胞

- 1) 倒出培养液, 用1×PBS清洗1次;
- 2) 每10 cm<sup>2</sup> 培养面积生长的细胞中加入1 mL TsingZol Reagent, 轻微晃动, 使本产品充分覆盖到细胞表面, 使用移液枪反复吹打使细胞裂解;
- 3) 将含有细胞的裂解液转移至离心管中, 用移液枪反复吹打直至裂解液中无明显沉淀, 室温静置5 min。

#### 1.3 悬浮细胞

- 1) 将悬浮培养细胞连同培养液一起转移至离心管中, 8,000×g 4°C离心2 min, 弃上清, 收集细胞;
- 2) 每5 × 10<sup>6</sup>~1 × 10<sup>7</sup>个细胞加入1 mL TsingZol Reagent;
- 3) 用移液枪反复吹打直至裂解液中无明显沉淀;
- 4) 室温静置5 min。

#### 1.4 血液

- 1) 直接取新鲜的血液, 加入3倍体积的TsingZol Reagent (推荐0.2 mL全血加入0.6 mL TsingZol Reagent), 充分振荡混匀;
- 2) 室温静置5 min。

**注: 样品经TsingZol Reagent匀浆后, 可在-70°C保存至少一个月。**

可选步骤:

对于蛋白、脂肪、多糖或胞外物质含量高的样品, 如肌肉组织、脂肪组织或植物的块茎, 可以在匀浆处理后12,000×g 4°C离心10 min以除去不溶物质。取澄清的匀浆溶液进行下一步操作。

2. 向上述裂解液中加入1/5 TsingZol Reagent体积的氯仿, 盖好管盖, 剧烈振

02

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。

03

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。

荡15 s, 溶液呈乳浊状, 室温静置5 min;

**注: 彻底混合有利于后续的相分离。**

3. 12,000×g 4°C 离心15 min。此时样品分为3层, 即上层无色的水相(含RNA)、中间层和下层粉红色的有机相。小心吸取上层水相转移至新的离心管中;

**注: 上层水相体积约占 TsingZol Reagent 体积的60%, 建议吸取500 μL左右, 避免吸取到中间层导致基因组DNA的污染。**

4. 加入等体积的异丙醇, 上下颠倒混匀, 室温放置10 min;

5. 12,000×g 4°C 离心10 min, 去上清, 此时管底会出现白色胶状沉淀;

6. 加入1 mL 75%乙醇(用RNase-free水配制)洗涤沉淀。7,500×g 4°C 离心5 min, 弃去上清;

7. 重复步骤6;

8. 室温晾干5~10 min。加入适量的RNase-free水溶解沉淀, 必要时可用移液器轻轻吹打或在55~60°C孵育5~10 min, 待沉淀完全溶解后将所得到的RNA溶液置于-70°C保存或用于后续试验。

**注: 不能使用真空离心机或加热的方法干燥RNA, 过分干燥会使RNA难以溶解, 导致 $A_{260}/A_{280}$ 值偏低。**

一般情况下的组织或细胞中所能提取的RNA量如下表:

样品	总RNA得量
植物叶片	100~1000 μg/g
动物组织	2~10 μg/mg
培养细胞	5~10 μg/10 <sup>6</sup> 个
全血	15~20 μg/mL

## RNA完整性及纯度检测

### 完整性检测

RNA可用琼脂糖凝胶电泳或使用Agilent 2100检测完整性。电泳检测对于没有降解的RNA可能有3条带(真核生物: 28S、18S、5.8S和5S rRNA, 原核生物: 23S、16S和5S rRNA), 28S和18S的条带亮度约为2:1表示RNA完整性较好, 如果rRNA条带弥散说明RNA可能存在降解。此外如果出现大于28S rRNA的条带说明可能存在基因组DNA的污染, 建议使用DNase I处理; 如果出现三条带以外的条带, 也可能是由于提取的总RNA中包含有叶绿体等细胞器中的rRNA。

### 纯度及浓度检测

用分光光度计检测产物纯度及浓度,  $A_{260}/A_{280}$ 比值在1.8~2.2之间表明RNA纯度较高, 当比值>2.2时, 表明RNA已水解为单核苷酸。

可按照下列公式计算RNA浓度: RNA浓度(ng/μL) =  $A_{260} \times$  稀释倍数  $\times$  40。

## 常见问题及原因分析

问题现象	可能原因
RNA得率低	样品研磨或裂解不充分
	RNA沉淀未完全溶解
RNA降解	样品处理或保存不当
	样品量过多, 试剂添加量过少, 导致裂解不充分
DNA污染	所用试剂及器材未经除RNase处理
	裂解时试剂添加量过少
蛋白和多糖污染	吸取上层水相时吸到中间层
	样品含有大量蛋白、多糖

蛋白和多糖污染	样品量过多
	吸取水相时吸到有机相
$A_{260}/A_{280}$ 值<1.65	RNA未充分溶解
	检测吸光度时, RNA产物未用TE溶解, 低离子强度及低pH会使 $A_{280}$ 值升高。
	相分离后, 吸取水相时吸到有机相
	裂解时试剂添加量过少
	加入本试剂后未室温静置5 min, 核酸蛋白复合物未完全分离

## 保存条件

2~-8°C保存1年。

## 技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议, 欢迎随时与我们联系: product@tsingke.com.cn。

