

# M5 HiPer Total RNA Extraction Reagent No Need Chloroform (TNCzol, 不要氯仿的 Trizol) 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Total RNA Extraction Reagent No Need Chloroform(TNCzol)	50ml	MF1048-01

**【储存条件】** 室温下能稳定保存 12 个月。为达到最佳效果，建议保存在 2~8°C。

## 【产品简介】

TNCzol 是传统 Trizol 的免氯仿升级版, 广泛适用于从各类动物组织、植物材料、培养细胞、细菌等样品中提取 Total RNA 和 Small RNA。与传统 Trizol 提取方法相比, 本产品不需要使用氯仿进行分层, 操作更简单, 且全程可在常温进行。本产品提取的 RNA 基本不残留 DNA, 提取的 RNA 可以直接用于 cDNA 克隆、qRT-PCR 检测、mRNA 纯化、体外翻译、Northern blotting 杂交、高通量测序等各种分子生物学实验。

## 【注意事项】

TNCzol 中含有苯酚, 具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会导致中毒、灼伤以及其他身体伤害。使用本制品时应穿戴防护物品, 如防护服装、手套、眼罩、面罩等。如果不小心中接触, 应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗。

RNA 最重要的指标就是没有降解完整性高, 目前普通的分光光度计包括 Nanodrop 是无法通过测量 OD260/280 和 OD260/230 来确认 RNA 是否降解的。判断 RNA 是否降解可以通过跑 1% 琼脂糖电泳检测通过直接观察 28S:18S 比值来判断是否降解, 或者用采用安捷伦 Bioanalyzer2100 仪器检测, 测定 RNA 产物的 RIN 值。

本品与传统 Trizol 一样属于通用型总 RNA 提取试剂, 具有和 Trizol 类似的适用范围。绝大部分常规动物组织细胞(如: 肝脏、肾脏、脑组织、培养细胞)、简单植物组织(如水稻、玉米、拟南芥、烟草、小麦等)都有良好效果。但是对于多糖多酚植物如棉花, 某些难破壁的细菌等样品不适用。

**【自备试剂】** 异丙醇(新开封或提取 RNA 专用)、75% 乙醇(用 RNase free H<sub>2</sub>O 配制)、RNase free H<sub>2</sub>O 或者 DEPC 处理过的水。

## 【操作步骤】

**温馨提示: 用 TNCzol 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。如无特殊说明, 所有的操作应该在在 15~30°C 的室温条件下。**

### 1. 样本处理

- 植物组织: 取新鲜植物组织在液氮中充分研磨或将植物组织剪碎后直接在 TNCzol 中迅速研磨, 每25-50 mg组织加入0.5 ml TNCzol, 混匀。
- 动物组织: 取新鲜或-70°C冻存动物组织尽量剪碎, 每15-50 mg组织加入0.5 ml TNCzol, 匀浆仪进行匀浆处理。或在液氮中研磨后加入0.5 ml TNCzol 混匀。
- 单层培养细胞: 尽量去除干净残留培养液后直接往直径3.5 cm 的培养板中加入0.5ml TNCzol 覆盖并反复吹打裂解细胞。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的TNCzol 量(每10 cm<sup>2</sup>加0.5 ml)。当TNCzol 量不足时可导致抽提的RNA 中污染有 DNA。

**注意：贴壁培养细胞往往不能完全从培养瓶（皿）脱落，这并不意味着裂解不完全，此时细胞膜实际已经完全破裂开，并已释放出全部RNA，继续做即可。**

d. 细胞悬液：离心收集细胞。在TNCzol 试剂中用移液管反复吹打来裂解细胞。每 $1 - 5 \times 10^6$  的动物细胞，植物细胞或每 $5 \times 10^6$  细菌加0.5 ml TNCzol。在加入TNCzol 前应避免洗涤细胞，因为那样会增加mRNA降解的可能性。破裂某些细菌可能需要使用匀浆器。

e. 液体样本：每200  $\mu$ l（低于200  $\mu$ l时，可用RNase-free H<sub>2</sub>O补足）血浆、血清等液体样本，加入0.5ml TNCzol 后振荡混匀。

2. 向上述裂解液中加入 2/5 体积的 RNase-free H<sub>2</sub>O(每 500  $\mu$ l TNCzol 加 200  $\mu$ l 水)，剧烈振荡混匀，室温静置 5 min。

**注意：当处理样本量较大50 mg 左右时，可延长室温静置时间到10 - 15 min。**

3. 室温 12,000 rpm 离心 15 min。

4. 离心后溶液分成上层水相(含 RNA)和下层沉淀(含蛋白质、DNA、多糖等杂质)，小心吸取上层水相至一个新的离心管中。

注意：上层水相约占总体积的90%，如用500  $\mu$ l TNCzol 进行提取，上层水相约为630  $\mu$ l，建议吸取500  $\mu$ l；提取微量样本时，为减少RNA损失，可以全部转移上清。

注意：当样本量较小时，离心后可能不会出现下层沉淀，属于正常现象，可继续按后续步骤完成提取。

5. 加入等体积异丙醇，颠倒混匀，室温静置 10 min。

6. 室温 12,000 rpm 离心 10 min。通常可以看见白色沉淀，小心弃去上清。

**注意：RNA沉淀在离心前通常不可见，离心后在管侧壁和管底形成薄片状沉淀（样品量少的情况下，RNA沉淀散在管侧壁和管底有可能看不到明显沉淀）。部分组织材料由于含有较多的代谢产物，导致沉淀不能聚集而分散在离心管壁上，此时，请沿液面缓慢吸取上清。**

7. 加入 1 ml 75%乙醇(RNase-free ddH<sub>2</sub>O 配制)漂洗，涡旋震荡 15 sec，让沉淀悬浮起来，并上下颠倒数次。

8. 室温 12,000 rpm 离心 3 min，小心弃上清。

9. 重复步骤 7 和 8 漂洗一遍，小心弃尽上清。

**注意：为减少杂质残留，应尽可能的将上清弃干净。建议弃去大部分上清后，短暂点甩离心将残留液体甩至管底，用200  $\mu$ l 吸头吸尽残留的液体，保留管底及管侧壁的白色RNA沉淀。**

10. 室温晾干约 1 min，加入适量约 50 -100  $\mu$ l RNase-free ddH<sub>2</sub>O 溶解沉淀，Flick 轻弹离心管底，让水充分接触管底和管侧壁的沉淀帮助溶解 RNA（可用移液器反复吹打管底和管侧壁的沉淀帮助溶解），使 RNA 沉淀充分溶解。提取的 RNA 产物可以分装后在 -85 ~ -65°C 长期保存，在 -30 ~ -15°C 仅可短期保存。

**注意：一般稍稍晾干RNA即可，过度干燥会导致RNA难于溶解。**

**注意：从某些样本提取RNA时，RNA沉淀并非完全聚集在离心管管底，而是也以均匀的薄雾状沉淀吸附在管侧壁上。请注意仔细观察，并用移液器吹打管底和沉淀所在的管侧壁充分溶解所有的RNA。**

#### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。