

Product Data Sheet

Product Name: TRizol NC Reagent
Cat. No.: GK20010

Components

Components	100 rxns	200 rxns
TRizol NC Reagent	50ml	100ml
Dilution Buffer	20ml	40ml

Features

Applications	<ul style="list-style-type: none"> • Safe and low in toxicity: No need for toxic and harmful reagents such as chloroform and β-mercaptoethanol • Ease to use: RNA extraction in a monophasic system, no phase separation, all operations at room temperature • High RNA quality: High purity and integrity of RNA at a yield comparable to the traditional Trizol method
Shipping	Ship with blue ice.
Storage	Store at 2-8°C, protected from light for 1 years.
Usage	For Research Use Only! Not For Use in Humans.

Protocol

自备材料：

异丙醇，75%乙醇(RNase-free ddH₂O配制)，RNase-free ddH₂O。

I.实验前的准备

提取RNA的关键是抑制细胞和环境中的RNA降解酶，防止所用设备和试剂中RNA降解酶的污染。因此，在实验中必须采取以下措施：戴一次性清洁手套和口罩；使用特殊的实验台进行RNA操作；操作过程中避免说话等。上述方法可以防止实验者的汗液和唾液的RNA降解酶污染。

注意：

1. 尽量使用一次性无酶无菌塑料耗材。如果使用玻璃器皿，应在使用前用37 °C的0.1%DEPC水溶液处理12小时，然后在120 °C高压灭菌30分钟以除去残留的DEPC。
2. 用于RNA实验的试剂必须采用干热（180°C，60min）灭菌或在DEPC水处理和灭菌后的玻璃容器中使用上述方法灭菌（也可使用无菌无核酶的一次性塑料容器），使用的无菌水必须用0.1%DEPC处理后再高压灭菌。
3. RNA实验用试剂和无菌水应专用，避免混合后交叉污染。
4. 本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及非合理用途。
5. 本产品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性，使用时应穿戴防护物品，如防护服装、手套、眼罩、面罩等。如果不慎接触到眼睛，应立即用大量的清水冲洗并前往医院治疗；接触到皮肤，请立即用大量去垢剂和清水冲洗，如仍有不适，请前往医

Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

Product Data Sheet

院治疗。

II 实验操作

1. 样本处理

1.1 动物/植物组织

1.1.1 将新鲜组织剪碎，用液氮速冻，迅速转移至液氮预冷的研钵中，用研磨杵迅速研磨，期间不断加入液氮，直至研磨成粉末状。

注：研磨不彻底会影响RNA的得率和质量。

1.1.2 将研磨成粉的样品转移至离心管中，大约每50mg组织加入500 μ L TRIzol NC Reagent，涡旋振荡至充分裂解，室温静置5min。

注：每500 μ L TRIzol NC Reagent最多可裂解50mg动物植物组织，过多的样本量可能会导致裂解不充分，并使产物纯度降低。肝脏、脾脏、肾脏等组织DNA/RNA含量丰富，过多样本量还会导致gDNA残留或产量降低。

注：若没有液氮研磨条件，可将新鲜组织尽量剪碎浸泡在TRIzol NC Reagent中，用电动匀浆器高速匀浆至组织块彻底裂解。

1.1.3 (优选)11,200rpm (12,000xg)室温离心5min。小心吸取上清至新的1.5ml离心管，切勿吸取沉淀。

注：若样本含有较多蛋白质、脂肪、多糖或肌纤维、植物块茎等，可离心去除不溶物质，离心得到的沉淀包含细胞膜、多糖、高分子量DNA等，而RNA存在于上清中。提取脂肪含量较高的组织样本时，若上层含有大量油脂，应去除。转移上清进行后续操作。

1.2 悬浮细胞

1.2.1 离心收集细胞，弃尽上清，每 1×10^6 - 1×10^7 个细胞加入500 μ L TRIzol NC Reagent。

1.2.2 涡旋振荡或用移液器反复吹打直至充分裂解，室温静置5min。

注：对于冻存细胞，加入TRIzol NC Reagent应立即进行振荡，否则会导致裂解不充分。

1.3 贴壁细胞

1.3.1 弃去细胞培养液，用1xPBS清洗一次，弃尽废液。

1.3.2 常规6孔板每孔或直径3.5cm平皿(约10cm²培养面积)的细胞加入500 μ L TRIzol NC Reagent，使之充分覆盖细胞表面，然后用移液器反复吹打细胞使其脱落。

注：对于贴壁牢固的细胞(细胞团)可采用细胞刮或者洁净的枪头剥离，或将TRIzol NC Reagent增加至1ml，亦可在加

Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

Product Data Sheet

入TRIzol NC Reagent 之前用胰酶将细胞消化下来，然后按照悬浮细胞处理。

1.3.3 将裂解液转移至1.5ml离心管，涡旋振荡或用移液器反复吹打直至充分裂解，室温静置5 min。

2. RNA提取

2.1所得裂解液中加入Dilution Buffer。

2.1.1动物/植物组织：每500 μ L TRIzol NC Reagent加入100 μ L Dilution Buffer；涡旋振荡至溶液充分混匀，室温静置5min。

2.1.2细胞：每500 μ L TRIzol NC Reagent加入150 μ L Dilution Buffer。盖紧离心管盖，涡旋振荡至溶液充分混匀，室温静置5min。

注：振荡时注意使溶液充分混匀为均一溶液，混匀不彻底影响RNA提取效率和杂质去除效率。

2.2 11,200rpm (12,000xg) 室温离心15 min。

2.3 小心取出离心管。此时样本中蛋白质、DNA、多糖等杂质沉淀到管底，RNA分布在上层溶液中，小心吸取上清溶液(约500 μ L)至一个新的离心管中。

注：上层溶液的体积约占总体积的90%，用500 μ L TRIzol NC Reagent进行提取，上层溶液约为500 μ L；触碰到下层沉淀会导致基因组及杂质污染。

注：部分样本上清轻微浑浊或有颜色，可继续后续操作，不影响产量和纯度。

注：组织投入量为50mg时，吸取上清溶液体积建议减少至450 μ L，避免吸到下层沉淀。

2.4 在得到的上清溶液中加入等体积异丙醇，上下颠倒充分混匀，室温静置10min。

2.5 11,200 rpm(12,000xg)室温离心10min，离心后在管侧和管底可以看见白色凝胶状RNA沉淀，小心弃去上清，勿丢失沉淀。

注：RNA含量少会导致沉淀不明显，小心弃去上清，勿丢失沉淀。

注：为减少杂质残留，此步骤尽可能将上清弃干净。

2.6 离心管中加入1ml 75%乙醇(RNase-free ddH₂O配制)清洗沉淀。轻弹管底，让沉淀悬浮起来，上下颠倒数次。

2.7 9,100rpm (8,000xg)室温离心3min，弃去上清，勿丢失沉淀。

2.8 重复步骤6和7一遍，弃尽上清。

注：为减少杂质残留，应尽可能的将上清液弃干净。建议弃去大部分上清后，短暂离心将所有液体甩至管底，再用10 μ L移液器将剩余液体吸掉，注意不要吸到沉淀。

2.9 超净工作台中吹干沉淀，加入20-100 μ L RNase-free ddH₂O溶解沉淀，室温涡旋3min(或使用移液器反复吹打)，使RNA沉淀充分溶解。提取的RNA产物可以分装后在-85~-65 长期保存，在-30~-15 短期保存。

注：通常，RNA沉淀晾干2-3min即可，不要过度晾干，RNA完全干燥后会很难溶解。RNA产物要充分溶解，否则可能导致浓度定量失准。

Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

Product Data Sheet

III 常见问题解决方案

常见问题	原因	解决方案
RNA产物溶解不完全	1.干燥时间过长	75%乙醇清洗后用10uL移液枪弃尽上清，控制干燥时间，避免过分干燥
	2.产物量过多	增加RNase-free ddH ₂ O投入量，延长溶解时间或55 ~ 60 °C水浴加热2 - 3min
	3.杂质过多	样本充分裂解后，离心取上清后再进行后续操作
RNA降解	1.存在RNase污染	确保所有离心管、枪头及相关溶液都必须无RNase污染；做好防护工作，戴口罩和一次性干净手套，并在单独的洁净区操作
	2.样本保存不当或样本保存时间过久	采用新鲜样本或经液氮速冻后保存于-85 ~ -65 °C的样本
	3.样本反复冻融	样本保存时，建议分装后保存，避免因反复冻融导致的降解；从液氮中取出的样本应迅速加入裂解液并充分混合均匀，防止样本因置于室温时间过长或与裂解液混合不均匀导致RNA降解
	4.电泳原因	电泳前将电泳槽用3%双氧水浸泡20min，然后用RNase-free ddH ₂ O进行冲洗；电泳缓冲液用RNase-free ddH ₂ O配制；更换新RNA专用的Loading Buffer
抑制下游或纯度低	1.蛋白质污染	减少样本起始投入量；增加TRIzol NC Reagent体积；勿触碰蛋白质沉淀
	2.多糖污染	减少样本起始投入量
	3.脂肪污染	建议增加1.1.3优选步骤
	4.盐残留	增加75%乙醇漂洗次数
	5.A260/230过低	增加75%乙醇漂洗次数
基因组DNA污染	1.样本投入量过高	减少样本起始投入量
		增加TRIzol NC Reagent体积
		样本裂解时，加适量HAc (每500μl TRIzol NC Reagent加5μl)
		逆转录时选择含有基因组去除模块的逆转录试剂，推荐使用SuperFast RT Master Mix for qPCR (gDNA remover)(Cat.No. GK10031)
		设计引物时选用跨内含子的引物，避免基因组DNA模板参与扩增反应
加入异丙醇离心后看不见沉淀	1.样本投入量低或RNA含量低	加入异丙醇后在2 ~ 8 °C 或-30 ~ -15 °C 放置10 - 30min后再离心
	2.沉淀丢失	进行弃上清操作时，采用吸取而不是倾倒的方法，勿丢失沉淀
	3.样本自身代谢产物多	沉淀会分散在离心管壁上，弃上清时沿液面缓慢吸取
各阶段保存时间	1. TRIzol NC Reagent 振荡混匀后	在4 °C 保存12h或-20 °C 保存一周
	2.加入75%乙醇后	在4 °C 保存12h或-20 °C 保存72h

Background

TRIzol NC Reagent是无需使用氯仿的总RNA提取试剂，广泛适用于培养细胞、动物组织、植物组织等样本。

TRIzol NC Reagent提取过程大约1小时，获得的总RNA可直接用于RT-PCR, qRT-PCR, Northern Blot, Dot Blot, 体外翻译和高通量测序等分子生物学实验。建议使用配套SuperFast RT Master Mix for qPCR (gDNA remover)(Cat.No. GK10031)逆转录试剂盒和SYBR Green qPCR Master Mix (Cat.No. GK10002) 实时荧光定量PCR试剂盒。

Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

Product Data Sheet

Sample size and RNA yield		
Sample type	Sample size	RNA yield
Leukocyte	1x10 ⁶ cells	10~20μg
Plant tissue	50mg	10~25μg
Cells	1x10 ⁶ cells	10-30μg
Tissues such as muscle/brain	50mg	10-25μg
Liver	50mg	100~300μg

本产品为蓝色溶液，提取RNA过程中，可将蛋白质、DNA、多糖等杂质沉淀于管底，且有明显蓝色沉淀分层，便于吸取RNA上清，可有效去除杂质，保证RNA的完整性和纯度。与传统TRIzol法相比，同等50mg组织样品需要添加0.5ml TRIzol NC Reagent，传统TRIzol Reagent需要添加1ml，更加节约试剂。本产品操作简便，可全程常温操作，并且无需使用氯仿进行分层，安全性更高。

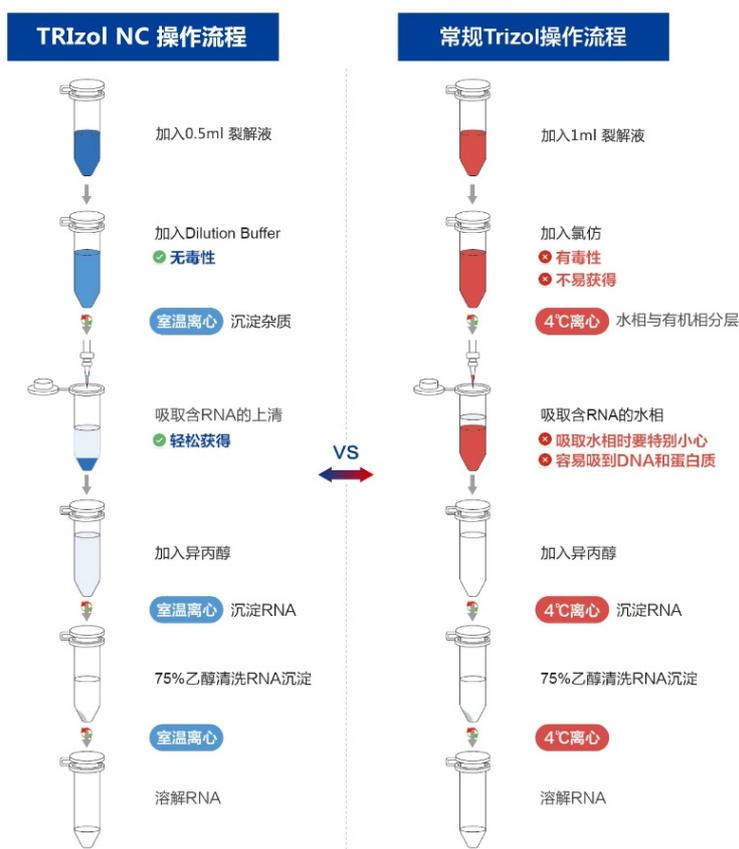


图1 TRIzol NC与常规Trizol操作流程对比图

Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA

Product Data Sheet

常见问题：

1. Q: 传统TRIZOL法提取RNA 需要4 离心，该产品则是常温条件下提取RNA吗？

A: 是的，TRIZOL NC Reagent可以常温提取RNA，裂解液成分可以充分保护RNA不受降解。如果在冰上操作和4 则更佳。

2. Q: 裂解液加入稀释液离心之后是否有分层？

A: 步骤2.2离心后可看见明显的蓝色下层沉淀和RNA上清液。

3. Q: 加入异丙醇离心后看不见沉淀？

A: 通常情况下，经过异丙醇沉淀可以看见白色胶状沉淀。若遇到沉淀不可见的情况，可能是RNA含量低或者组织投入量过低，建议加大投入量并增加TRIZOL NC Reagent的使用量；且在步骤2.5-2.8弃上清操作时，采用吸取而不是倾倒的方法，以免沉淀丢失；取上层溶液，加5-10 μ g RNase-free糖原作为载体与RNA共沉淀。此外，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，经过75%的乙醇清洗RNA沉淀之后，白色团块状沉淀会聚集和明显。

4. Q: 该产品的适用范围？

A: TRIZOL NC Reagent可以提取细胞样品，动物植物组织样品。对血液样本不适用，对动物白色脂肪组织不适用。血液样本建议使用TRIZOL LS Reagent (Cat.No. GK20009)。动物白色脂肪组织样本建议使用TRIZOL Reagent (Cat.No. GK20008)。

Caution: Product has not been fully validated for medical applications. For research use only.

Tel: (909) 407-4943 Fax: (626) 353-8530 E-mail: tech@glpbio.com

Address: 10292 Central Ave. #205, Montclair, CA, USA