

版本号: 221219

AIDzol Reagent (No Chloroform)
AIDzol Reagent 总 RNA 提取试剂 (免氯仿)

目录号: RN65

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	(RN6501)	(RN6502)
AIDzol Reagent (4°C 避光)	50 ml	100 ml

❖ **储存事项:**

AIDzol 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 的环境下。

❖ **重要提示:**

本品中含有苯酚, 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。如果不小心接触, 应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗。

❖ **产品介绍:**

AIDzol 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:**

1. 自备试剂: 异丙醇 (新开封或提取 RNA 专用)、75% 乙醇 (用 RNase free

H₂O 配制)、 RNase free H₂O 或者 DEPC 处理过的水。

2. 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 OD_{260/280} 和 OD_{260/230} 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。
3. AIDzol 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。

❖ RNA 抽提操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

提示: 用 AIDzol 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℃ 的室温条件下。

1. 样本处理

- a. 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 AIDzol 中迅速研磨, 每25 - 50 mg组织加入0.5 ml AIDzol, 混匀。
- b. 动物组织: 取新鲜或-70℃冻存动物组织尽量剪碎, 每15 - 50 mg组织加入0.5 ml AIDzol, 匀浆仪进行匀浆处理。或在液氮中研磨后加入0.5 ml AIDzol 混匀。
- c. 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 AIDzol 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AIDzol 量(每10 cm²加0.5 ml)。当 AIDzol 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 AIDzol 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 5×10^6 细菌加 0.5 ml AIDzol。在加入 AIDzol 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 μ l（低于 200 μ l 时，可用 RNase-free H_2O 补足）血浆、血清等液体样本，加入 0.5ml AIDzol 后振荡混匀。

2. 向上述裂解液中加入 2/5 体积的 RNase-free H_2O （每 500 μ l AIDzol 加 200 μ l 水），剧烈振荡混匀，室温静置 5 min。

▲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。

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

▲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。

▲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 dd H_2O 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。

▲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 μ 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 μ l RNase-free ddH₂O 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。

▲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。