

## Simzol 试剂说明书

### 产品组成

|           |         |         |         |
|-----------|---------|---------|---------|
| Cat. No.  | 5302006 | 5302100 | 5302200 |
| Simzol 试剂 | 6 ml    | 100 ml  | 200 ml  |
| 说明书       | 1 份     | 1 份     | 1 份     |

### 产品储存与有效期

产品如果储存于室温（15~25℃），可在一年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8℃，可延长产品的有效期至三年以上。

**!!! 2~8℃储存的产品必须恢复至室温（大于 15℃）方可使用，详见“使用前准备”。**

### 技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：电话：400-0099-857，QQ: 869912443，微信公众号：simgenbio，e-mail: technical@simgen.cn。

### 产品介绍

Simzol试剂适合从各种样品（如人类或动物来源的细胞、组织和体液、植物、酵母、细菌、病毒材料等）中分离纯化总RNA。在匀质化或溶解的样品中，Simzol试剂可保持RNA的完整性，同时能破坏细胞并溶解细胞成分。Simzol无需添加氯仿，只需加入RNase-free水混匀离心后，DNA、多糖和蛋白质等杂质即可沉淀去除，RNA存在于上清液中，并可通过分别添加乙醇和异丙醇来分离miRNA和大片段RNA。

Simzol试剂提取的总RNA可用于Northern blot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。Simzol试剂可除去样本中大部分DNA，但不能彻底去除DNA，因此在RT-PCR反应中，如果设计的两条引物位于单个外显子中时，应选用DNase I（Simgen Cat. No. 8003050）处理分离出的 RNA，或者选择含有DNA酶消化步骤的cDNA第一链合成试剂盒（Simgen Cat. No. 7306100）合成cDNA。

### 用户需自备的试剂与物品

1. 75%乙醇（用 DEPC 处理水配制）、异丙醇
2. RNase-free 水或者 DEPC 处理水
3. RNase-free 的 1.5 ml 离心管和移液器及吸头
4. 一次性手套及防护用品和纸巾
5. 台式少量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 可能需要液氮与研钵，可能需要 18-25 号针头的注射器（动物组织）
7. 可能需要 PBS 溶液、70%异丙醇（用 DEPC 处理水配制）
8. 无 RNA 酶使用的实验室

### 使用前准备

1. **由于 Simzol 试剂的浊点在 10℃左右，2~8℃储存的 Simzol 试剂会变浑浊并最终形成分相。使用前必须恢复至室温（可水浴至 20℃），并混匀形成透明均一的溶液后再使用。**
2. 注意：Simzol 试剂中含有刺激性化合物，会腐蚀皮肤，必须戴手套和护目镜进行操作。
3. 离心机如果有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
4. RNase-free 水处理方法：将去离子纯水加入到可灭菌的玻璃容器中，加入焦磷酸二乙酯（DEPC）至终浓度为 0.1% (v/v)，37℃静置过夜，121℃，20 分钟灭菌。

## 操作步骤：

### 总RNA提取步骤：

本操作步骤是为用500  $\mu$ l Simzol试剂提取总RNA而设计的，如果从更多组织或细胞中提取RNA，须将所加的Simzol试剂及异丙醇、75%乙醇等用量按比例增加。如果从微量组织或者细胞（1~10 mg组织或 $10^2$ ~ $10^4$ 细胞）中提取RNA，则应在步骤5的异丙醇沉淀步骤中补加Carrier RNA（Simgen Cat. No. 4003101）5~10  $\mu$ g。Carrier RNA的存在不影响RT-PCR。

#### 1. 不同来源样本的处理：

##### 动物或植物组织 / 植物细胞 / 酵母 / 细菌：

在研钵中用液氮将约150~250 mg组织研磨至粉末状，用液氮预冷过的1.5 ml离心管称取25~50 mg组织，加入500  $\mu$ l Simzol试剂。用装有18-25号针头的注射器反复抽吸8~10次。注意将针头保持在液面之下，以减少泡沫的产生。吸取匀浆液转移到一个1.5 ml离心管中，进入步骤3的操作。

\* 尽量在组织粉末尚未融化前加入Simzol，以减少组织内源性的RNA酶对RNA的降解。

##### 培养的动物细胞：

**贴壁培养的细胞：**每10 cm<sup>2</sup>培养细胞中加入500  $\mu$ l Simzol试剂（比如直径为3.5 cm细胞培养皿，弃尽培养基后，直接加入500  $\mu$ l Simzol试剂），勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，吸取匀浆液转移到一个1.5 ml离心管中，进入步骤3的操作。

**悬浮培养的细胞：**用1.5 ml离心管离心收集 $5 \times 10^6$ 细胞，加200  $\mu$ l PBS溶液，旋涡振荡直至细胞全部悬浮，加入500  $\mu$ l Simzol试剂，勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，**注意无需再加入200  $\mu$ l RNase-free水，直接进入步骤4的操作。**

##### 液体样本：

每200  $\mu$ l液体样本（比如血液、血浆等）加入500  $\mu$ l Simzol试剂，旋涡振荡混匀。当样品体积小于200  $\mu$ l时，用RNase-free水补到200  $\mu$ l，再加入500  $\mu$ l Simzol试剂混合均匀。**注意无需再加入200  $\mu$ l RNase-free水，直接进入步骤4的操作。**

2. **可选步骤：**如果样本中含有较多蛋白质，脂肪，多糖或胞外物质（肌腱，植物结节部分等）可于12000 $\times$ g离心5分钟，取上清。离心得到的沉淀中包括细胞外膜，多糖，高分子量DNA，上清中含有RNA。处理脂肪组织时，顶层所含的大量油脂应去除。取离心后澄清的溶液进入下一步操作。

3. 加入200  $\mu$ l RNase-free水，盖上管盖，用力摇晃15秒，室温孵育5分钟。

\* 组织样本量为50 mg时，建议在室温下孵育15分钟。

4. 12000 $\times$ g离心15分钟，吸取500  $\mu$ l上清液到一个新的RNase-free 1.5 ml离心管中。

5. 加入500  $\mu$ l异丙醇，混合均匀，12000 $\times$ g离心10分钟，弃上清。

6. 加入1 ml 75%乙醇，温和地翻转离心管4~6次，8000 $\times$ g离心5分钟，弃上清。

\* 如果观察到RNA沉淀较多，可重复步骤6一次，以减少RNA中盐分的残留。

7. 盖上管盖，低速离心数秒使管壁上的乙醇沉降到管底。用200  $\mu$ l吸头吸尽残留的乙醇，保留管底及管壁的白色RNA沉淀。无须干燥RNA。

\* 注意：从某些样本中提取RNA时，RNA不是在离心管管底形成白点，而是会以均匀的薄雾状沉淀形式吸附在管壁上。

请注意仔细观察并在步骤8操作时特别留意将RNase-free水加到管壁的相应位置上溶解RNA。

8. 加入50~100  $\mu$ l RNase-free水溶解RNA，并将RNA储存于-70 $^{\circ}$ C备用。

## miRNA和大片段RNA分开提取步骤：

本操作步骤是为用500  $\mu$ l Simzol试剂提取RNA而设计的，如果从更多组织或细胞中提取RNA，须将所加的Simzol试剂及75%乙醇、异丙醇、70%异丙醇等用量按比例增加。

### 1. 不同来源样品的处理：

#### 动物或植物组织 / 植物细胞 / 酵母 / 细菌：

在研钵中用液氮将约150~250 mg组织研磨至粉末状，用液氮预冷过的1.5 ml离心管称取25~50 mg组织，加入500  $\mu$ l Simzol试剂。用装有18-25号针头的注射器反复抽吸8~10次。注意将针头保持在液面之下，以减少泡沫的产生。吸取匀浆液转移到一个1.5 ml离心管中，进入步骤3的操作。

\* 尽量在组织粉末尚未融化前加入Simzol，以减少组织内源性的RNA酶对RNA的降解。

#### 培养的动物细胞：

**贴壁培养的细胞：**每10  $\text{cm}^2$ 培养细胞中加入500  $\mu$ l Simzol试剂（比如直径为3.5 cm细胞培养皿，弃尽培养基后，直接加入500  $\mu$ l Simzol试剂），勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，吸取匀浆液转移到一个1.5 ml离心管中，进入步骤3的操作。

**悬浮培养的细胞：**用1.5 ml离心管离心收集 $5 \times 10^6$ 细胞，加200  $\mu$ l PBS溶液，旋涡振荡直至细胞全部悬浮，加入500  $\mu$ l Simzol试剂，勿弃吸头，直接用吸头吹打细胞数次使细胞溶解，**注意无需再加入200  $\mu$ l RNase-free水，直接进入步骤4的操作。**

#### 液体样本：

每200  $\mu$ l液体样本（比如血液、血浆等）加入500  $\mu$ l Simzol试剂，旋涡振荡混匀。当样品体积小于200  $\mu$ l时，用RNase-free水补到200  $\mu$ l，再加入500  $\mu$ l Simzol试剂混合均匀。**注意无需再加入200  $\mu$ l RNase-free水，直接进入步骤4的操作。**

2. **可选步骤：**如果样本中含有较多蛋白质，脂肪，多糖或胞外物质（肌腱，植物结节部分等）可于12000 $\times$ g离心5分钟，取上清。离心得到的沉淀中包括细胞外膜，多糖，高分子量DNA，上清中含有RNA。处理脂肪组织时，顶层所含的大量油脂应去除。取离心后澄清的溶液进入下一步操作。

3. 加入200  $\mu$ l RNase-free水，盖上管盖，用力摇晃15秒，室温孵育5分钟。

\* 组织样本量为50 mg时，建议在室温下孵育15分钟。

4. 12000 $\times$ g离心15分钟，吸取500  $\mu$ l上清液到一个新的RNase-free 1.5 ml离心管中。

5. 加入200  $\mu$ l 75%乙醇，混合均匀，室温孵育10分钟，12000 $\times$ g离心8分钟。此时大片段RNA将在管底形成沉淀，保留沉淀进入步骤7的操作。将含有miRNA的上清液转移到一个新的RNase-free 1.5 ml离心管中。

6. 加入500  $\mu$ l异丙醇（约0.8倍体积），混合均匀，在4 $^{\circ}$ C孵育30分钟，12000 $\times$ g离心15分钟，弃上清。此时管底将形成miRNA沉淀。

7. 向大片段RNA沉淀（步骤5）中加入1 ml 75%乙醇，向miRNA沉淀（步骤6）中加入1 ml 70%异丙醇，混合均匀，8000 $\times$ g离心3分钟，弃上清。

\* 如果观察到RNA沉淀较多，可重复步骤7一次，以减少RNA中盐分的残留。

8. 盖上管盖，低速离心数秒使管壁上的液体沉降到管底。用200  $\mu$ l吸头吸尽残留的乙醇或异丙醇，保留管底及管壁的白色RNA沉淀。无须干燥RNA。

\* 注意：从某些样本中提取RNA时，RNA不是在离心管管底形成白点，而是会以均匀的薄雾状沉淀形式吸附在管壁上。

请注意仔细观察并在步骤9操作时特别留意将RNase-free水加到管壁的相应位置上溶解RNA。

9. 向大片段RNA沉淀（步骤5）中加入50~100  $\mu$ l RNase-free水溶解大片段RNA，向miRNA沉淀（步骤6）中加入10~50  $\mu$ l RNase-free水溶解miRNA，并将RNA储存于-70 $^{\circ}$ C备用。

## 常见问题与分析：

### 1. RNA降解

#### (1) 使用了陈旧的样本或者样本没有保存好。

- ① 使用新鲜样本提取。
- ② 样本贮存：组织样本取材后应立即置于液氮中速冻，然后移至 -70℃冰箱保存；细胞样本应在收集后直接加入500 μl Simzol试剂，然后移至 -70℃冰箱保存。如果不能立即放入 -70℃冰箱保存，可选购RNA样本保存液（Simgen Cat. No. 4007020/4007100）保存样本。当使用RNA样本保存液时，应注意以下事项：
  - A. 只选用新鲜的、未反复冻融的样本加入RNA样本保存液保存；
  - B. 样本中加入RNA样本保存液后不要长时间室温存放。RNA样本保存液保存样本是有时间期限的，一般在37℃下只能保存1天，在15-20℃下可延长至1周，在2-8℃可延长至4周，若长期保存，应保存在 -20℃或更低的温度下保存。

#### (2) 外源RNA酶的污染。

试剂，器械及实验环境中的RNA酶进入实验系统。实验过程中必须戴手套和口罩，并在无RNA酶污染的实验室提取RNA。

#### (3) 电泳环节出现降解。

电泳检测时，推荐使用甲醛变性胶电泳（参考分子克隆第三版第540页）。如果没有甲醛变性胶电泳的条件，关注simgenbio微信公众号查询《如何做好RNA电泳实验》文章，获取相关实验技巧。

### 2. RNA提取得率低

#### (1) 样本RNA含量低或样本未充分破碎或匀浆不彻底。

增加样本用量，延长研磨时间或用移液器反复吹打混匀。

#### (2) RNA沉淀没有被完全溶解。

增加RNase-free水的体积和延长溶解时间。

### 3. DNA污染

#### (1) 样本DNA含量过多或样本用量过多。

- ① 将Simzol试剂、异丙醇、75%乙醇等试剂的用量按比例增加。
- ② 即使电泳检测观察不到DNA条带，也不应认为纯化的RNA中不含基因组DNA污染。如需要彻底除去DNA，请用不含RNA酶的DNase I（需单独订购，Simgen, Cat.No.8003050）消化残留的DNA。

### 4. A260/A280比值<1.6

#### (1) 用于匀浆裂解的Simzol试剂体积过少。

将Simzol试剂、异丙醇、75%乙醇等试剂的用量按比例增加。

#### (2) 多糖或蛋白的污染。

勿省略操作步骤2。

### 5. RNA后续实验效果不佳

#### (1) 使用了过多的RNA用作反转录模板。

通常20 μl反转录反应体系中加入100~1000 ng RNA作为模板比较适宜。注意cDNA作为PCR模板时需要适当稀释，以免残留的反转录酶（包括已经失活的反转录酶）干扰Taq酶的活性。

#### (2) 反转录后的DNA-RNA复合体对荧光PCR的影响。

建议减少随机引物的用量或用特异性引物进行反转录，或者在反转录后添加RNase H进行处理，去除DNA-RNA复合体。