

Simzol 试剂说明书

产品组成

Cat. No.	5302006	5302100	5302200
Simzol 试剂说明书	6 ml 1 份	100 ml 1 份	200 ml 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. RNase-free 水或者 DEPC 处理水、异丙醇、75%乙醇（用 DEPC 处理水配制）
2. RNase-free 的 1.5 ml 离心管和移液器及吸头
3. 一次性手套及防护用品和纸巾
4. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
5. 可能需要液氮与研钵，可能需要匀浆器（动物组织）
6. 可能需要 PBS 溶液、70%异丙醇（用 DEPC 处理水配制）
7. 无 RNA 酶使用的实验室



扫描二维码观看操作视频

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 μ 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 的细胞）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 μ 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100~200 mg组织研磨至粉末状，用液氮预冷过的1.5 ml离心管称取25~100 mg组织，加入500 μ l Simzol试剂，盖上管盖，用力摇晃混合均匀，进入步骤3的操作。

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

* 动物组织可在加入500 μ l Simzol试剂的情况下用匀浆器或其他机械破坏方法帮助组织裂解。

培养的动物细胞：

贴壁培养的细胞：每10 cm²培养细胞中加入500 μ l Simzol试剂（比如直径为3.5 cm的细胞培养皿，弃尽培养基后，直接加入500 μ 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 ~ 10×10^6 的细胞，加200 μ l PBS溶液，旋涡振荡直至细胞全部悬浮，加入500 μ 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 μ l RNase-free水，直接进入步骤4的操作。**

液体样本：

每200 μ l液体样本（比如血液、血浆等）加入500 μ l Simzol试剂，盖上管盖，用力摇晃混合均匀。当样品体积小于200 μ l时，用RNase-free水补到200 μ l，再加入500 μ l Simzol试剂混合均匀。**注意无需再加入200 μ 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脂质，可于12000 \times g离心5分钟。离心后顶部会出现脂肪层，用吸头吸取下层澄清的溶液到一个新的1.5 ml离心管中，进入下一步操作。

3. 加入200 μ l RNase-free水，盖上管盖，用力摇晃15秒。

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

5. 加入500 μ 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 μ 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 μ l RNase-free水溶解RNA，并将RNA储存于-70 $^{\circ}$ C以下备用。

miRNA和大片段RNA分开提取步骤：

本操作步骤是为用500 μ 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100~200 mg组织研磨至粉末状，用液氮预冷过的1.5 ml离心管称取25~100 mg组织，加入500 μ l Simzol试剂，盖上管盖，用力摇晃混合均匀，进入步骤3的操作。

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

* 动物组织可在加入500 μ l Simzol试剂的情况下用匀浆器或其他机械破坏方法帮助组织裂解。

培养的动物细胞：

贴壁培养的细胞：每10 cm^2 培养细胞中加入500 μ l Simzol试剂（比如直径为3.5 cm的细胞培养皿，弃尽培养基后，直接加入500 μ 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 $5\sim 10\times 10^6$ 的细胞，加200 μ l PBS溶液，旋涡振荡直至细胞全部悬浮，加入500 μ 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 μ l RNase-free水，直接进入步骤4的操作。**

液体样本：

每200 μ l液体样本（比如血液、血浆等）加入500 μ l Simzol试剂，盖上管盖，用力摇晃混合均匀。当样品体积小于200 μ l时，用RNase-free水补到200 μ l，再加入500 μ l Simzol试剂混合均匀。**注意无需再加入200 μ 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脂质，可于12000 \times g离心5分钟。离心后顶部会出现脂肪层，用吸头吸取下层澄清的溶液到一个新的1.5 ml离心管中，进入下一步操作。
3. 加入200 μ l RNase-free水，盖上管盖，用力摇晃15秒。
4. 12000 \times g离心15分钟，吸取500 μ l上清液到一个新的RNase-free 1.5 ml离心管中。
5. 加入200 μ 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 μ 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 μ 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 μ l RNase-free水溶解大片段RNA，向miRNA沉淀（步骤6）中加入10~50 μ l RNase-free水溶解miRNA，并将RNA储存于-70 $^{\circ}$ C以下备用。

用配套的RNA纯化柱套装纯化总RNA操作步骤：

Simzol试剂配合RNA纯化柱套装使用可以简化操作步骤，提高获得的RNA的纯度，并降低获得的RNA中盐分的残留。RNA纯化柱套装订购信息：Cat. No. 5302-A。

本操作步骤是为用500 µl 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 $10^2\sim 10^4$ 细胞）中提取RNA，则应在步骤5加入70%乙醇的步骤中补加Carrier RNA (Simgen Cat. No. 4003101) 5~10 µg。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100~200 mg组织研磨至粉末状，用液氮预冷过的1.5 ml离心管称取25~100 mg组织，加入500 µl Simzol试剂，盖上管盖，用力摇晃混合均匀，进入步骤3的操作。

- * 尽量在组织粉末尚未融化前加入Simzol试剂，以减少组织内源性的RNA酶对RNA的降解。
- * 动物组织可在加入500 µl Simzol试剂的情况下用匀浆器或其他机械破坏方法帮助组织裂解。

培养的细胞：

贴壁培养的细胞：每10 cm²培养细胞中加入500 µl Simzol试剂（比如直径为3.5 cm的细胞培养皿，弃尽培养基后，直接加入500 µl 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 $5\sim 10\times 10^6$ 的细胞，加200 µl PBS溶液，旋涡振荡直至细胞全部悬浮，加入500 µl 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 µl RNase-free 水，直接进入步骤4的操作。**

液体样本：

每200 µl液体样本（比如血液、血浆等）加入500 µl Simzol试剂，盖上管盖，用力摇晃混合均匀。当样品体积小于200 µl时，用RNase-free水补到200 µl，再加入500 µl Simzol试剂混合均匀。**注意无需再加入200 µl 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×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 µl 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×g离心15分钟，吸取500 µl上清液到一个新的RNase-free 1.5 ml离心管中。

5. 加入280 µl无水乙醇，混合均匀。

6. 吸取步骤5中的混合液转移到核酸纯化柱（核酸纯化柱置于2 ml离心管中）中，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

7. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，在核酸纯化柱中加入800 µl Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm离心30秒。

- * 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2 ml离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

- * 确认在Buffer WBR中已经加入无水乙醇。

8. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，在核酸纯化柱中加入300 µl Buffer WBR，盖上管盖，14000 rpm离心1分钟。

- * 如果离心机的离心速度达不到14000 rpm，则用最高速离心2分钟。

9. 弃2 ml离心管及滤液，将核酸纯化柱置于一个RNase-free的1.5 ml离心管中，在纯化柱中加入50~100 µl RNase-free Water，盖上管盖，室温静置1分钟，12000 rpm离心30秒。

- * 注意取出核酸纯化柱时不要让滤液触及核酸纯化柱底部，如果核酸纯化柱沾染有滤液，请弃尽滤液后将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中14000 rpm空离1分钟，再取出核酸纯化柱进行此操作步骤。

- * 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为8000 rpm离心1分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

10. 弃纯化柱，洗脱的RNA可立即用于各种分子生物学实验；或者将RNA储存于-70℃以下备用。

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，延长匀浆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

样本DNA含量过高或样本用量过多。

- ① 减少样本用量或将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) 样本用量过多，用于匀浆裂解的Simzol试剂体积过少。

减少样本用量或将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。

样本中含有较多的多糖或蛋白，可在样本处理步骤加入Simzol试剂后，12000×g离心5分钟，取上清液进入步骤3的操作。离心得到的沉淀中包含有细胞外膜，多糖，高分子量蛋白及DNA等杂质。

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。