



产品使用说明书

---

## 外泌体提取和 DNA 分离试剂盒

细胞培养上清或尿液

# Exosome Extraction & DNA Isolation Kit

For cell culture media/urine

**Cat.#**    EXODNA10B-1  
              EXODNA20B-1

---

辽宁润基生物科技有限公司

Liaoning Rengen Biosciences Co.,Ltd

Version 2.0

01/01/2020

## 目录

保存和应用 .....	2
产品介绍 .....	3
试剂盒组成和说明 .....	4
操作方法 .....	5
相关产品信息 .....	7
常见问题 .....	7
技术支持 .....	12

## 保存与应用

### 【保存条件】

本试剂盒低温下运输，室温或 2-8℃ 下保存至少 12 个月（按照试剂盒不同成分分别保存），使用前请仔细阅读说明书。

### 【应用范围】

本产品只用于科学研究，不能用于临床诊断。

## 产品介绍

外泌体(Exosome)是由不同细胞分泌的直径 30-200nm 的胞外膜性囊泡(extrocellular visicles,EVs)。外泌体普遍存在于多种体液中,其内容物丰富,包括蛋白质、脂质、核酸等,在细胞间信息交流中发挥着重要作用,主要参与免疫抗原呈递,神经递质传递,脂类代谢,及细胞信号转导等过程,并与多种疾病的发生、发展、治疗及预后密切相关。

近年来,液体活检作为一种新的非侵入式主要检测血液中循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cell, CTC)和循环肿瘤 DNA(Circulating Tumor DNA,ctDNA),获取患者肿瘤病变信息,用以帮助诊断治疗,同时研究表明,在外泌体中已检测到基因组 DNA 和线粒体 DNA (Thakur BK et al.2014;Akiko Takahashi et al.2017; Kahlert et al.2014),为了帮助研究人员对外泌体 DNA 的研究和应用,我们开发了外泌体提取和 DNA 分离试剂盒,可方便、快捷分离血清或血浆中不含有其它 DNA 污染的外泌体 DNA。

外泌体提取和 DNA 分离试剂盒(Exosome Extraction & DNA Isolation Kit)适用于从细胞培养上清或尿液中分离得到的外泌体,首先利用专门设计和表面修饰的树脂来捕获(浓缩)样本中的外泌体,根据外泌体的结构特点,树脂可快速有效地与外泌体结合,进而分离(浓缩)样本中外泌体,然后采用优化的裂解液释放分离的外泌体中 DNA,采用吸附柱(Spin Columns)法可方便、快捷地纯化、洗脱外泌体 DNA,可直接用于下游应用,如 real time PCR, expression array assays, NGS 等。

## 参考文献

Thakur BK,et al.Double-stranded DNA in exosomes:a novel biomarker in cancer detection. Cell Research (2014)24:766-769.

Akiko Takahashi,et al.Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells.Nature Communications(2017)8:15287.

Christoph Kahlert,et al.Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer.J Biol Chem.(2014)289(7):3869-3875.

## 试剂盒组成和说明

产品组成 (Cat.# EXODNA20B-1)	容量	保存条件
结合缓冲液 C (Binding Buffer C)	20ml	2-8°C
结合树脂 C (Binding Resin C)	8ml	2-8°C
洗涤液 C (Washing Buffer C)	20ml	2-8°C
洗脱液 C (Elution Buffer C)	8ml	2-8°C
裂解液 D (Lysis Buffer D)	10ml	2-8°C
洗涤液 A (Wash Solution A) *	15ml	RT
洗脱液 A (Elution Solution A)	10ml	RT
DNase I 酶 (1mg/ml) **	0.5ml	-20°C
蛋白酶 K (20mg/ml)	0.5ml	2-8°C
纯化柱 (Spin Columns Containing Resin) /2.0ml 收集管 (Collection Tubes 2.0ml)	20 套	RT
吸附柱 (Spin columns) /2.0 收集管 (Collection Tubes 2.0ml)	20 套	RT
2.0ml 离心管 (Centrifuge Tubes 2.0ml)	20 个	RT
1.5ml 离心管 (Centrifuge Tubes 1.5ml)	20 个	RT
产品组成 (Cat.# EXODNA10B-1)	容量	保存条件
结合缓冲液 C (Binding Buffer C)	10ml	2-8°C
结合树脂 C (Binding Resin C)	4ml	2-8°C
洗涤液 C (Washing Buffer C)	10ml	2-8°C
洗脱液 C (Elution Buffer C)	4ml	2-8°C
裂解液 D (Lysis Buffer D)	6ml	2-8°C
洗涤液 A (Wash Solution A) *	15ml	RT
洗脱液 A (Elution Solution A)	10ml	RT
DNase I 酶 (1mg/ml) **	0.5ml	-20°C
蛋白酶 K (20mg/ml)	0.5ml	2-8°C
纯化柱 (Spin Columns Containing Resin) /2.0ml 收集管 (Collection Tubes 2.0ml)	10 套	RT
吸附柱 (Spin columns) /2.0 收集管 (Collection Tubes 2.0ml)	10 套	RT
2.0ml 离心管 (Centrifuge Tubes 2.0ml)	10 个	RT
1.5ml 离心管 (Centrifuge Tubes 1.5ml)	10 个	RT

\*使用前先在每瓶洗涤液 A (Wash Solution A) 中加入 45ml 无水乙醇，混匀，并在瓶标签上标记“√”，每次使用后立即盖紧瓶盖。

\*\*DNase I 酶置于-20°C 环境下保存。

### 【注意事项】

1. 结合树脂彻底混匀后快速吸取。
2. 各产品组分根据要求在合适的温度下保存，自购买之日起有效期至少一年。

试剂盒在使用前先**恢复室温**，裂解液 D 在使用前检查是否有盐沉淀，建议在使用前 37℃ 水浴 10 分钟，混合均匀，无沉淀，溶液清澈。

3. 本试剂盒只适用于**细胞培养上清或尿液**样本。
4. 本试剂盒每个反应是基于 10ml 细胞培养上清或尿液作为起始体积，样本不足时，需要用水或 PBS 补充至 10ml。
5. 本试剂盒所有离心均在**室温**下进行。
6. 需要自备试剂：**预冷的无水乙醇**。

## 操作方法

### 一、外泌体提取

#### 1. 样本预处理

对于冻存细胞培养上清或尿液样品，室温或 25℃ 水浴解冻，将完全融化的样品置于冰上；对于新鲜的细胞培养上清或尿液样品，收集样品后置于冰上，3,000×g，4℃ 离心 15min，去除细胞或细胞碎片，离心后将上清吸入新管中。

#### 2. 外泌体结合

吸取 10ml 上述处理的细胞培养上清或尿液于 15ml 离心管中（试剂盒不提供），加入 1.0ml 的**结合缓冲液 C**，盖紧盖子，颠倒混匀。

#### 3. 外泌体浓缩

吸取 400μl **结合树脂 C**（吸取前彻底混匀结合树脂，快速吸取）加入步骤 2 的 15ml 离心管中，盖紧盖子，室温颠倒混匀 15min 后，1,500×g 室温离心 2min。轻轻将离心管从离心机中取出，用移液器取 400μl 上清液（不要弃掉），小心倒掉剩余上清液，用移液器中的液体（400μl）轻轻吹起树脂，全部转移至纯化柱中（已放入收集管），静置 2min，2,000×g 室温离心 2min，弃去滤液，将纯化柱放回收集管中。

#### 4. 外泌体洗涤

取 500μl **洗涤液 C** 加到纯化柱中（已放入收集管），静置 3min，3,000×g 室温离心 2min，弃去滤液，重复洗涤一次。

#### 5. 外泌体洗脱及去除游离 DNA

将纯化柱转移至低吸附蛋白的 2.0ml 离心管中（试剂盒提供），加入 400μl

洗脱液 C, 静置 5min, 300×g 室温离心 2min, 将滤液重新加入纯化柱, 静置 2min, 最后 3,000×g 离心 2min。离心收集的溶液加入 20μl DNase I 酶, 混匀, 37°C 孵育 15min, 恢复室温。

## 二、外泌体 DNA 分离

### 1. 外泌体 DNA 释放

向上述溶液中加入 20μl 蛋白酶 K 溶液, 混匀, 56°C 孵育 10min, 简短离心, 离去管壁液体, 恢复室温。加入 400μl 裂解液 D, 涡旋振荡 15sec, 室温放置 5min。加入 800μl 预冷的无水乙醇, 充分颠倒混匀 (此时可能产生白色絮状沉淀) 后室温放置 5min。

**注意: 裂解液 D 在使用前应恢复室温, 为了提高提取效率建议裂解液 D 使用前 37°C 水浴 10 分钟后使用。**

### 2. 外泌体 DNA 结合

将上一步所得溶液和沉淀分 3 次加入吸附柱中 (已放入收集管中, 每次上柱体积不得大于 700μl), 室温静置 2min, 8,000×g 离心 30sec, 倒掉收集管中的滤液, 将吸附柱放入收集管中。

### 3. 外泌体 DNA 洗涤

向吸附柱加入 500μl 洗涤液 A (请检查是否已加入指定量的无水乙醇), 室温静置 2min, 8,000×g 离心 30sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中, 重复洗涤 1 次。将吸附柱放入收集管中 12,000×g 再离心 2min, 去除残液。打开吸附柱盖子, 于室温放置 5-10min, 以彻底晾干吸附材料中残余的洗涤液。

**注意: 这一步的目的是将吸附柱中的残余的洗涤液去除, 洗涤液中的乙醇的残留会影响后续的酶反应 (酶切、PCR 等) 实验。**

### 4. 外泌体 DNA 洗脱

将吸附柱转入新的 1.5ml 离心管中 (试剂盒提供), 向吸附柱中间位置悬空滴加 50-200μl 洗脱液 A, 室温放置 2min, 12,000×g 离心 2min, 离心得到的溶液再加入吸附柱中, 室温放置 2min, 12,000×g 离心 2min, 最后离心管中液体为提取的外泌体 DNA, 可直接应用于下游实验或保存在 -20°C。

**注意: 洗脱液体积不应小于 50μl, 体积过小会影响回收效率。洗脱液的 pH 对于洗脱效率有很大影响, 若用水做洗脱液应保证 pH 值在 7.0-8.5 范围内, pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。**

## 相关产品信息

应用	相关产品	目录号
外泌体提取	外泌体提取试剂盒(血清/血浆)	EXORG50A-1/ EXORG30A-1
	外泌体提取试剂盒 (细胞培养上清/尿液)	EXORG24B-1/ EXORG10B-1
	外泌体提取和纯化试剂盒 (血清/血浆)	EXORG10SP-0.5/ EXORG10SP-1.0/ EXORG10SP-4.0
	外泌体浓缩试剂盒 (细胞培养上清/尿液)	EXOCon10-10/ EXOCon05-10
外泌体 DNA 分离	外泌体 DNA 分离试剂盒	EXODNA50C-1/ EXODNA30C-1
	外泌体提取和 DNA 分离试剂盒 (血清/血浆)	EXODNA50A-1/ EXODNA30A-1
	外泌体提取和 DNA 分离试剂盒 (细胞培养上清/尿液)	EXODNA20B-1/ EXODNA10B-1
外泌体 RNA 分离	外泌体 RNA 分离试剂盒	EXORNA50C-1/ EXORNA30C-1
	外泌体提取和 RNA 分离试剂盒 (血清/血浆)	EXORNA50A-1/ EXORNA30A-1
	外泌体提取和 RNA 分离试剂盒 (细胞培养上清/尿液)	EXORNA20B-1/ EXORNA10B-1
外泌体标记和纯化	DiO-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (green)	EXOPDiO10-1/ EXOPDiO20-1
	DiI-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (red)	EXOPDiI10-1/ EXOPDiI20-1
	DiR-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (red)	EXOPDiR10-1/ EXOPDiR20-1
	PKH67-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (green)	EXOPPKH67-10/ EXOPPKH67-20

## 常见问题

**Q1:** 外泌体提取和纯化试剂盒是特异分离样本中外泌体吗?

**A1:** 外泌体提取和纯化试剂盒分离外泌体的原理是依据外泌体的膜结构特点,设计和修饰特异结合外泌体的树脂,通过与外泌体脂质双分子层组成成分结合,

而几乎不与样本中其它蛋白质结合来实现外泌体的提取和纯化的，所以不能区分颗粒的大小，即含有其它囊泡。

**Q2: 如何鉴定提取的外泌体?**

**A2:** 外泌体是体细胞分泌的细胞外囊泡群体中一种，直径一般为 30-150nm，通常确定外泌体一般需要三个条件：电镜形态观察，颗粒粒径测定和蛋白标志物检测（Western Blot 检测 CD9，CD81，CD63，Alix，TSG101 等）。

**Q3: 提取外泌体 DNA 时，需要在什么温度下离心?**

**A3:** 所有离心步骤须在室温下操作，在 4°C 时离心会降低 DNA 的产量。

**Q4: 提取的外泌体 DNA 下游应用时，如 PCR 不是很好?**

**A4:** 洗脱的外泌体 DNA 中含有乙醇和/或有较多盐离子污染，会抑制 PCR 反应。所以，在最后洗涤时，将吸附柱置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的洗涤液。

**Q5: 如何定量提取的外泌体 DNA?**

**A5:** 外泌体 DNA 含量较少，所以，用常规定量 DNA 方法是很难的，并且不同样本外泌体含量不同，含有的 DNA 量也不同。一般定量 DNA 方法有：

- 1) Bioanalyzer RNA Quantification Kits
- 2) NanoDrop 2000
- 3) Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay Kit
- 4) qPCR Standard Curve

**Q6: 为什么提取的外泌体 DNA A260/280 低于 2.0?**

**A6:** 大部分外泌体 DNA 是片段化基因组 DNA，长度大约 100-300bp，且浓度很低，DNA 的 A260/280 比值会随 DNA 浓度降低而降低，正常 A260/280 比值在 1-1.6 之间，低的 A260/280 比值不会影响下游应用。

**Q7: 细胞培养时，如何去除培养基中牛血清来源的外泌体?**

**A7:** 多数情况下，体外细胞培养时培养基中需要添加牛来源血清，但血清中含有大量牛源外泌体，会污染细胞分泌的外泌体，可以采取以下两种方法：

- (1) 当细胞长到近乎单层，换成无血清培养基，在 24-48 小时后收集细胞培养上清。
- (2) 将血清以 100,000g 超速离心 10h 以上去除血清外泌体，或者购买商业化的

去除外泌体的血清。

**Q8:** 应用“外泌体纯化试剂盒”浓缩细胞培养上清中外泌体后，得到的外泌体很纯吗？

**A8:** 外泌体浓缩试剂盒只是用于将较大体积的细胞培养上清或尿液中外泌体浓缩为小体积，便于下游应用。在浓缩过程中，细胞培养上清中的小分子和离子可以去除，但是一些蛋白质不能去除，所以，浓缩后想要得到较纯的外泌体，需要做外泌体纯化处理，如 SEC 纯化柱或润基生物的“外泌体纯化试剂盒”来实现。





## 技术支持

关于查看详细产品信息和下载相关资料请登陆：<http://www.rengenbio.com>

同时可通过电话或 Email 接触技术支持。

## 辽宁润基生物科技有限公司

地址：辽宁省沈阳市经济技术开发区十三号路 77 号联东 U 谷 20 号楼

邮编：110027

电话：024-31086590

传真：024-31086589

邮箱：公司信息 [info@rengenbio.com](mailto:info@rengenbio.com)

技术支持 [support@rengenbio.com](mailto:support@rengenbio.com)

产品订购 [order@rengenbio.com](mailto:order@rengenbio.com)



微信公众号



外泌体研究交流群