



产品使用说明书

外泌体提取和 RNA 分离试剂盒

血清或血浆

Exosome Extraction & RNA Isolation Kit

For blood serum/plasma

Cat.# **EXORNA30A-1**
 EXORNA50A-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..... | 8 |
| 技术支持 | 12 |

保存与应用

【保存条件】

本试剂盒 2-8℃下运输，室温或 2-8℃下保存至少十二个月，按照试剂盒不同成分分别保存，使用前请仔细阅读说明书，使用前需恢复室温并充分混匀。

【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 30-150nm 的胞外膜性囊泡(Extracellular Vesicles, 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、脂质和核酸等,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。

研究表明,胞外膜性囊泡(包括外泌体)内容物中富含不同类型 RNA(mRNA 和 microRNA 等)。microRNA(miRNA)在基因转录和转录后调节方面起重要作用,与疾病的发生、发展密切相关,因此,某些外泌体 miRNA(exo-miRNA)可以作为疾病的新的治疗靶标和诊断生物标记物。

润基生物研发的外泌体提取和 RNA 分离试剂盒,能够简单、快速地捕获生物样本中外泌体,并高效分离外泌体中的 RNA(包括 miRNA)。其主要原理是依据外泌体的膜结构特点(脂质双分子层),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,采用酚/胍盐方法提取已分离的外泌体中总 RNA(包括 miRNA),利用核酸特异吸附柱,可方便、快捷地纯化外泌体 RNA,获得的 RNA 可直接用于下游应用,如 realtime RT-PCR, Northern blot, 芯片表达谱分析, NGS 测序等。

试剂盒组成和说明

| 产品组成 Cat.# EXORNA30A-1 | 规格 | 保存条件 |
|---|--------|-------|
| 平衡缓冲液 (Equilibration Buffer) | 15ml | 2-8°C |
| 结合缓冲液 (Binding Buffer) | 60ml | 2-8°C |
| 洗涤缓冲液 (Washing Buffer) | 15ml | 2-8°C |
| 裂解液 A (Lysis Buffer A) | 18ml | 2-8°C |
| 裂解液 B (Lysis Buffer B) | 4.5ml | RT |
| 洗涤液 A (Wash Solution A) * | 15ml | RT |
| 洗脱液 A (Elution Solution A) | 5ml | RT |
| 外泌体纯化柱 (EXO Spin Columns Containing Resin) /2.0ml 收集管 (Collection Tubes 2.0ml) | 30 套 | RT |
| RNA 吸附柱 (RNA Spin Columns) /收集管 (Collection Tubes 2.0ml) | 30 套 | RT |
| 1.5ml 离心管 (Centrifuge Tubes 1.5ml) | 30 个 | RT |
| 产品组成 Cat.# EXORNA50A-1 | 规格 | 保存条件 |
| 平衡缓冲液 (Equilibration Buffer) | 25ml | 2-8°C |
| 结合缓冲液 (Binding Buffer) | 50ml×2 | 2-8°C |
| 洗涤缓冲液 (Washing Buffer) | 25ml | 2-8°C |
| 裂解液 A (Lysis Buffer A) | 30ml | 2-8°C |
| 裂解液 B (Lysis Buffer B) | 7.5ml | RT |
| 洗涤液 A (Wash Solution A) * | 15ml | RT |
| 洗脱液 A (Elution Solution A) | 5ml | RT |
| 外泌体纯化柱 (EXO Spin Columns Containing Resin) /2.0ml 收集管 (Collection Tubes 2.0ml) | 50 套 | RT |
| RNA 吸附柱 (RNA Spin Columns) /收集管 (Collection Tubes 2.0ml) | 50 套 | RT |
| 1.5ml 离心管 (Centrifuge Tubes 1.5ml) | 50 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。

【注意事项】

1. 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半年。
试剂盒在使用前先恢复室温，裂解液 A 在使用前检查是否有盐沉淀，建议在使用前 37°C 水浴 10 分钟，混合均匀，无沉淀，溶液清澈。
2. 本试剂盒只适用于血清或血浆样本。
3. 本试剂盒每个反应是基于 0.5ml 血清或血浆作为起始体积，样本不足时，需

要用无核酸酶水补充至 0.5ml，但样本量不要低于 200 μ l。

4. 本试剂盒所有离心均在**室温**下进行。
5. 预防 RNase 污染，应注意以下几方面：
 - 经常更换新手套，防止皮肤表面 RNase 污染。
 - 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 - RNA 释放后在裂解液中不会被 RNase 降解，但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料盒或玻璃器皿，玻璃器皿可在 150°C 烘烤 4h，塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除 RNase。
 - 配制溶液应使用无 RNase 的水（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓度 0.1% (v/v)，放置过夜，高压灭菌）。
6. 需要自备试剂：**96-100% 乙醇**。

操作方法

1. 样本预处理

对于冻存血清或血浆，室温或 25°C 水浴解冻，将完全融化的样品置于冰上；对于新鲜血清或血浆，收集样品后置于冰上，12,000 \times g，离心 15min，去除细胞或细胞碎片，离心后将上清吸入新管中。

注意：试剂盒在使用前需恢复室温。

2. 纯化柱平衡

吸取 500 μ l 平衡缓冲液加入外泌体纯化柱中（已放入收集管），500 \times g 离心 2min，弃去滤液，外泌体纯化柱重新放入收集管中，待用。

3. 外泌体结合

吸取 500 μ l 处理的血清或血浆放入 5.0ml 离心管中（试剂盒不提供），加入结合缓冲液 1.5ml，颠倒混匀后静置 2min，然后将混合液分 3 次（每次大约 700 μ l）加入已平衡的外泌体纯化柱中（已放入收集管），500 \times g 离心 2min，每次倒掉滤液。

4. 外泌体洗涤

吸取 0.5ml 洗涤缓冲液加入外泌体纯化柱中（已放入收集管），500 \times g 离心 2min，然后再 1,500 \times g 离心 4min，弃去滤液和收集管。

5. 外泌体 RNA 释放

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

- 将外泌体纯化柱放入新的 2.0 ml 无 RNase 的离心管中（试剂盒不提供），加入 600 μ l 裂解液 A，150 \times g 离心 2min，然后 5,000 \times g 离心 2min，弃外泌体纯化柱，滤液涡旋震荡 30s，室温静置 5min，使得核酸蛋白复合物完全分离。
- 将得到的裂解产物加入 150 μ l 裂解液 B，盖好管盖，剧烈振荡 30sec，室温放置 5min。室温 12,000 \times g 离心 15min，样品会分成三层：黄色的有机相，中间层和无色的水相，RNA 主要在水相中（上层），把水相(避免吸取中间层)转移到新的 1.5ml 无 RNase 离心管中（试剂盒不提供），进行下一步操作。
- 量取转移液的体积，缓慢加入 1.5 倍体积预冷的无水乙醇（如 400 μ l 的转移液加 600 μ l 无水乙醇），颠倒混匀(此时可能会出现沉淀)后室温静置 5-10min。

6. 外泌体 RNA 结合

将得到的溶液和沉淀一起转入 RNA 吸附柱中（已放入收集管中），每次上柱体积不得大于 700 μ l，可分 2 次完成，室温静置 2min，室温 8,000 \times g 离心 30sec，离心后弃掉滤液，保留 RNA 吸附柱。

7. 外泌体 RNA 洗涤

向 RNA 吸附柱加入 500 μ l 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，室温 8,000 \times g 离心 30sec，倒掉收集管中的滤液，将吸附柱放入收集管中，重复洗涤 1 次。将空柱于室温 12,000 \times g 再离心 2min，去除残余液体。打开 RNA 吸附柱盖子，将 RNA 吸附柱置于室温放置 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。

8. 外泌体 RNA 洗脱

将 RNA 吸附柱转入新的无 RNase 的 1.5 ml 离心管中（试剂盒提供），向 RNA 吸附柱中间位置悬空滴加 50-200 μ l 洗脱液 A，室温放置 2min，室温 12,000 \times 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 \times g 离心 2min，最后离心管中液体为提取的外泌体 RNA，可直接应用于下游实验或保存在-80°C。

注意：洗脱液体积不应小于 50 μ l，体积过小影响回收效率。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，且 RNA 产物最好立即使用，或保存在-80°C，以防止 RNA 降解。

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: 提取外泌体 RNA 时,需要在什么温度下离心?

A2: 所有离心步骤须在室温下操作,在 4°C 时离心会降低 RNA 的产量。

Q3: 提取的外泌体 RNA 中有 DNA 污染?

A3: 外泌体裂解分相时, RNA 在上层水相中,而 DNA 在中间层,转移上层水相时,要注意不要吸到中间层,所以要保留部分水相,不要全吸取。

Q4: 提取的外泌体 RNA 下游应用时,如果 RT-PCR 不是很好?

A4: 洗脱的外泌体 RNA 中含有乙醇和/或较多盐离子污染,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 RNA?

A5: 外泌体 RNA 含量较少 (1-100 pg/ μ L),所以,用常规定量 RNA 方法是很难的,并且不同样本外泌体含量不同,含有的 RNA 量也不同。一般定量 RNA 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 RNA A260/280 低于 2.0?

A6: 大部分外泌体 RNA 是小 RNA,且浓度很低, RNA 的 A260/280 比值会随 RNA 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。

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：辽宁省沈阳市铁西区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

技术支持 support@rengenbio.com

产品订购 order@rengenbio.com



微信公众平台



外泌体科研交流平台