



产品使用说明书

外泌体提取和 RNA 分离试剂盒

细胞培养上清或尿液

Exosome Extraction & RNA Isolation Kit

For cell culture media/urine

Cat.# EXORNA10B-1
EXORNA20B-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 | 3 |
| 操作方法 | 5 |
| 相关产品信息 | 7 |
| 常见问题 | 7 |
| 技术支持 | 9 |

保存与应用

【保存条件】

本试剂盒低温下运输,裂解液 B、洗涤液 B、洗脱液 B 及耗材室温保存(15-25°C),其它试剂应在 2-8°C下保存,可保存 12 个月。

【应用范围】

本产品只用于科学研究,不能用于临床诊断。

本产品仅适用于细胞培养上清或尿液中外泌体提取和 RNA 分离。

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。

外泌体提取和 RNA 分离试剂盒 (Exosome Extraction & RNA Isolation Kit) 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, 然后采用酚/胍盐方法提取已分离外泌体中总 RNA (含有 mRNA 和 miRNA), 利用核酸特异吸附柱 (Spin Columns), 可方便、快捷地纯化和洗脱外泌体 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.# EXORNA10B-1 | 数量 | 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 A (Lysis Buffer A) | 4ml | 2-8°C |
| 裂解液 B (Lysis Buffer B) | 1.5ml | RT |
| 洗涤液 A (Wash Solution A)* | 15ml | RT |
| 洗脱液 A (Elution Solution A) | 5ml | RT |
| 纯化柱 A (Spin Columns A)/收集管 (Collection Tubes 2.0ml) | 10 套 | RT |
| 吸附柱 B (Spin Columns B)/收集管 (Collection Tubes 2.0ml) | 10 套 | RT |
| 1.5ml 离心管 (Centrifuge Tubes 1.5 ml) | 10 个 | RT |

| 产品组成 Cat.# EXORNA20B-1 | 数量 | 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 A (Lysis Buffer A) | 8ml | 2-8°C |
| 裂解液 B (Lysis Buffer B) | 3ml | RT |
| 洗涤液 A (Wash Solution A)* | 15ml | RT |
| 洗脱液 A (Elution Solution A) | 5ml | RT |
| 纯化柱 A (Spin Columns A)/收集管 (Collection Tubes 2.0ml) | 20 套 | RT |
| 吸附柱 B (Spin Columns B)/收集管 (Collection Tubes 2.0ml) | 20 套 | RT |
| 1.5ml 离心管 (Centrifuge Tubes 1.5 ml) | 20 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. 裂解液 A 在使用前检查是否有盐沉淀，使用前先恢复室温，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. 各试剂使用前请颠倒混合均匀，尤其是结合树脂彻底混匀后快速吸取。
3. 本试剂盒所有离心如未明确说明则均在室温下进行。
4. 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）。
5. 需要自备试剂：96-100% 乙醇。

操作方法

一、外泌体提取

1. 样本预处理

对于冻存的细胞培养上清或尿液，室温或 25°C 水浴解冻，将完全融化的样品置于冰上；对于新鲜的细胞培养上清，收集样品后置于冰上，3,000×g，4°C 离心 10min，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. 外泌体提取

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 A 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 A 放回收集管中。

4. 外泌体洗涤

取 500μl 洗涤液 C 加到纯化柱 A 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

将纯化柱 A 转移至低吸附蛋白的 2ml 离心管中（试剂盒不提供），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，离心管中所得液体即为提取的外泌体溶液。

二、外泌体 RNA 分离

6. 外泌体 RNA 释放

- 量取分离的外泌体，加入等体积（约 380μl）的裂解液 A，涡旋振荡 30sec，室温放置 5min，使得核酸蛋白复合物完全分离。室温 12,000×g 离心 10min，取上清，转入一个新的 1.5ml 无 RNase 离心管中（试剂盒不提供）。

- 加入 100 μ l **裂解液 B**, 剧烈振荡 30sec, 室温放置 5min, 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), 把水相转移到新的 1.5ml 无 RNase 离心管中 (试剂盒不提供)。 (避免吸取中间层), 进行下一步操作。
- 量取转移液体积, 缓慢加入 1.5 倍体积预冷的无水乙醇 (如 500 μ l 的转移液加 750 μ l 无水乙醇), 混匀 (此时可能会出现沉淀) 后, 室温放置 5min。

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使用前 37 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟后使用。

7. 外泌体 RNA 分离

将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 B 中 (已放入收集管), 每次上柱体积不得大于 700 μ l, 可分多次完成), 室温静置 2min, 8,000 \times g 离心 30sec, 弃滤液, 将吸附柱 B 放回收集管中。

8. 外泌体 RNA 洗涤

向吸附柱 B 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, 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。将吸附柱 B 于 12,000 \times g 再离心 2min, 去除残余液体。打开 RNA 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。

9. 外泌体 RNA 洗脱

将吸附柱 B 转入新的 1.5 ml 离心管中 (试剂盒提供), 向吸附柱中间位置悬空滴加 50-100 μ l **洗脱液 A**, 室温放置 2min, 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 $^{\circ}$ C。

注意: 洗脱液体积不应小于 50 μ l, 体积过小会影响回收效率, 为增加 RNA 的得率, 可将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。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 $^{\circ}$ 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: 细胞培养时，如何去除培养基中牛血清来源的外泌体？

A1: 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。

Q2: 提取的外泌体如何保存?

A2: 短时间内使用，可在 2-8°C 保存一周，若长时间保存，建议放在 -80°C 冰箱中，避免反复冻融，另外，最好是使用低吸附蛋白的保存管。

Q3: 如何鉴定提取的外泌体?

A3: 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）。

Q4: 本试剂盒提取外泌体方法与超速离心方法相比有哪些优势?

A4: 主要表现在：操作简单，不需要额外仪器设备，节省时间，可小体积样本提取等。

Q5: 提取外泌体 RNA 时，需要在什么温度下离心?

A5: 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。

Q6: 提取的外泌体 RNA 中有 DNA 污染?

A6: 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。

Q7: 提取的外泌体 RNA 下游应用时，如 RT-PCR 不是很好?

A7: 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。

Q8: 如何定量提取的外泌体 RNA?

A8: 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

Q9: 为什么提取的外泌体 RNA A260/280 低于 2.0?

A9: 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