



产品使用说明书

---

## 外泌体提取和 DNA 分离试剂盒

血清或血浆

## Exosome Extraction & DNA Isolation Kit

For blood serum/plasma

**Cat.#**      **EXODNA50A-1**  
                 **EXODNA30A-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℃下保存至少一年（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 (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。

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, 用以辅助诊断、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体液 (血清/血浆等) 中分离得到的外泌体, 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, 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.# EXODNA50A-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
洗脱缓冲液 (Elution Buffer)	15ml	2-8°C
裂解液 D (Lysis Buffer D)	15ml	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) **	1.0ml	-20°C
蛋白酶 K (20mg/ml)	1.0ml	2-8°C
纯化柱 (Spin Columns Containing Resin) /2.0ml 收集管 (Collection Tubes 2.0ml)	50 套	RT
吸附柱 (Spin Columns) /收集管 (Collection Tubes 2.0ml)	50 套	RT
1.5ml 离心管 (Centrifuge Tubes 1.5ml)	50 个	RT
产品组成 Cat.# EXODNA30A-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
洗脱缓冲液 (Elution Buffer)	10ml	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)	30 套	RT
吸附柱 (Spin Columns) /收集管 (Collection Tubes 2.0ml)	30 套	RT
1.5ml 离心管 (Centrifuge Tubes 1.5ml)	30 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. 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°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 $\mu$ l。
4. 本试剂盒所有离心均在**室温**下进行。
5. 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

对于冻存血清或血浆样品，室温或 25 $^{\circ}$ C 水浴解冻，将完全融化的样品置于冰上；对于新鲜的血清或血浆样品，收集后置于冰上，12,000 $\times$ g，4 $^{\circ}$ C 离心 15min，去除细胞或细胞碎片，离心后将上清吸入新管中。

#### 2. 纯化柱平衡

吸取 500 $\mu$ l **平衡缓冲液**加入纯化柱中（已放入收集管中），500 $\times$ g 离心 2min，弃去滤液，纯化柱重新放入收集管中，待用。

#### 3. 外泌体结合

吸取 500 $\mu$ 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，颠倒混匀后室温静置 5-10min，然后将混合液分 3 次（每次大约 700 $\mu$ l）加入已平衡的纯化柱中（已放入收集管中），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**加入纯化柱中（已放入收集管中），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. 外泌体洗脱及去除游离 DNA

将纯化柱放入新的 1.5ml 离心管中（试剂盒不提供），吸取 0.2ml **洗脱缓冲液**加入纯化柱中，500 $\times$ g 离心 2min，离心得到的溶液再加入此纯化柱中，500 $\times$ g 离心 2min，离心收集的溶液加入 10 $\mu$ l DNase I 酶，37 $^{\circ}$ 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 10 $\mu$ l 蛋白酶 K 溶液，混匀，56 $^{\circ}$ C 孵育 10min，简短离心，离去管壁液体，恢复室温。加入 200 $\mu$ l 裂解液 D，涡旋振荡 15sec，室温放置 5min。加入 400 $\mu$ l 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 $^{\circ}$ 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两次加入吸附柱中（吸附柱放入收集管中，每次上柱体积不得大于 700 $\mu$ l），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。

### 3. 外泌体 DNA 洗涤

向吸附柱加入 500 $\mu$ 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 $\times$ 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 50-200 $\mu$ 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 DNA，可直接应用于下游实验或保存在-20 $^{\circ}$ C。

**注意：洗脱液体积不应小于 50 $\mu$ l，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。







## 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