

产品使用说明书

外泌体 DNA 分离试剂盒

Exosome DNA Isolation Kit

Cat.# **EXODNA50C-1**
 EXODNA30C-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
常见问题	6
相关产品信息	7
技术支持	8

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 vesicle, 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,用以辅助诊断、治疗,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,我们研制了外泌体 DNA 分离试剂盒(Exosome 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,采用优化的裂解液提取分离的外泌体中 DNA,这里外泌体分离方法可以包括超速离心、化学沉淀、免疫捕获和分子大小排阻等,接下来采用核酸特异吸附柱(Spin Columns),可方便、快捷地纯化和洗脱外泌体 DNA,可直接用于下游应用,如 realtime PCR,基因突变检测,NGS 测序和 microarray 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.# EXODNA50C-1)	规格	保存条件
裂解液 D (Lysis Buffer D)	15ml	2-8℃
洗涤液 A (Wash Solution A) *	15ml	RT
洗脱液 A (Elution Solution A)	10ml	RT
蛋白酶 K (20mg/ml)	1.0ml	2-8℃
吸附柱 (Spin columns) /2.0ml 收集管 (Collection Tubes 2.0 ml)	50 套	RT
1.5ml 离心管 (Centrifuge Tubes 1.5 ml)	50 个	RT
产品组成 (Cat.# EXODNA30C-1)	规格	保存条件
裂解液 D (Lysis Buffer D)	7ml	2-8℃
洗涤液 A (Wash Solution A) *	15ml	RT
洗脱液 A (Elution Solution A)	10ml	RT
蛋白酶 K (20mg/ml)	0.5ml	2-8℃
吸附柱 (Spin columns) /2.0ml 收集管 (Collection Tubes 2.0 ml)	30 个	RT
1.5ml 离心管 (Centrifuge Tubes 1.5 ml)	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。

【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℃ 水浴 10 分钟，混合均匀，无沉淀，溶液清澈。
2. 本试剂盒所有离心均在**室温**下进行。
3. 需要自备试剂：**预冷的无水乙醇**。

操作方法

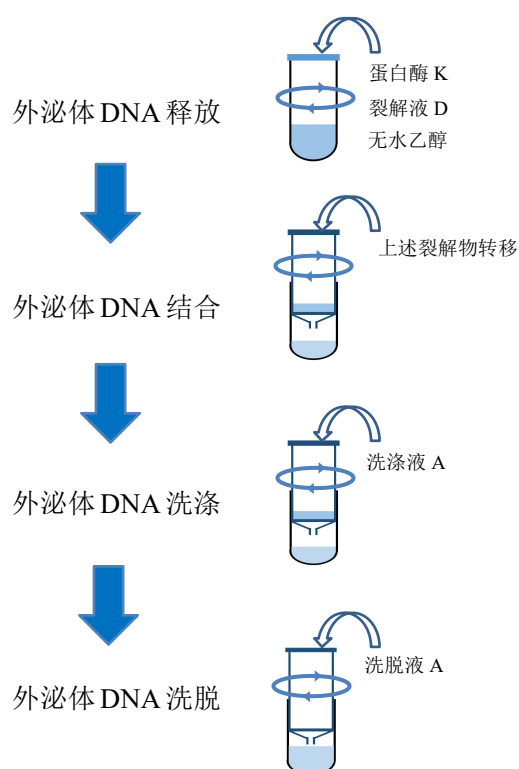


图 1 简单操作流程

1. 外泌体 DNA 释放

取 200 μ l 分离的外泌体溶液，加入 10 μ l 蛋白酶 K 溶液，混匀，56 $^{\circ}$ C 孵育 10min，恢复室温。加入 200 μ l 裂解液 D，涡旋振荡 15sec，室温放置 5min。加入 400 μ 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 μ 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 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 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 DNA，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。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。

常见问题

Q1: 提取外泌体 DNA 时，需要在什么温度下离心？

A1: 所有离心步骤须在室温下操作，在 4 $^{\circ}$ C 时离心会降低 DNA 的产量。

Q2: 提取的外泌体 DNA 下游应用时，如 PCR 不是很好？

A2: 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。

Q3: 如何定量提取的外泌体 DNA？

A3: 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-iTTM RiboGreen[®] RNA Assay Kit
- 4) qPCR Standard Curve

Q4: 为什么提取的外泌体 DNA A260/280 低于 2.0？

A4: 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。

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

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。

公司：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

技术支持 support@rengenbio.com

产品订购 order@rengenbio.com



微信公众号



外泌体研究交流群