

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 1.0

01/6/2018

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	6
常见问题	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 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，用以帮助诊断治疗，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，本公司研制了外泌体 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已分离的外泌体中 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、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、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	容量	保存温度
裂解液 D (Lysis Buffer D)	15ml	2-8℃
洗涤液 A (Wash Solution A) *	15ml×2	RT
洗脱液 A (Elution Solution A)	10ml	RT
蛋白酶 K (20mg/ml)	1.0ml	RT
吸附柱 (Spin columns)/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	容量	保存温度
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	RT
吸附柱 (Spin columns)/收集管 (Collection Tubes 2.0 ml)	30 套	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 35ml 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 D (Lysis Buffer D) 保存在 2-8℃，其余试剂盒和耗材保存在室温下 (15-25℃)，自购买之日起有效期至少 1 年。裂解液 A 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. 所有的样品使用前请平衡到室温 (15-25℃)。
3. 第一次使用试剂盒时，请按照试剂瓶上的提示在洗涤液 A 中添加无水乙醇。

操作方法

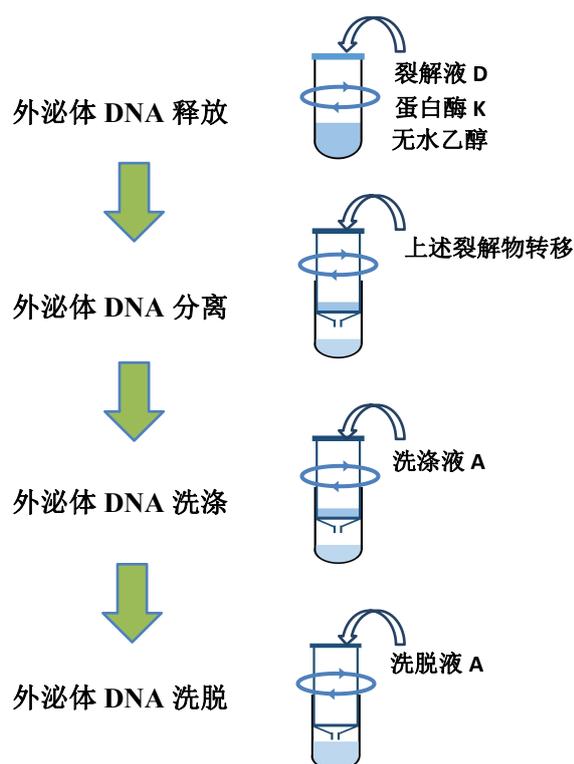


图 1 简单操作流程图

注意：使用前先在每瓶洗涤液 A (Wash Solution A) 中加入 35ml 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。

1. 外泌体 DNA 释放

取 200 μ l 分离的外泌体溶液,加入等体积(200 μ l)的裂解液 D, 涡旋振荡 15sec, 室温放置 5min。加入 10 μ l 蛋白酶 K 溶液, 混匀, 56 $^{\circ}$ C 孵育 10min, 简短离心以出去管盖内壁的液滴, 恢复室温。加入 400 μ l 预冷的无水乙醇, 充分颠倒混匀, 此时可产生白色沉淀。

2. 外泌体 DNA 分离

分两次将上一步所得溶液和沉淀都加入一个吸附柱中(吸附柱放入收集管中), 14,000 \times g 离心 30sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放入收集管中。

3. 外泌体 DNA 洗涤

向吸附柱加入 500 μ l 洗涤液 A, 14,000 \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，14,000×g 离心 2min，倒掉废液，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漂洗液。

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 1.5 ml 离心管中（试剂盒提供），向吸附柱中间位置悬空滴加 50-200μl 洗脱液 A，室温放置 2-5min，14,000×g 离心 2min，将溶液收集到离心管中。

注意：洗脱液体积不应小于 50μl，体积过小会影响回收效率，为增加 DNA 的得率，可将离心得到的溶液再加入吸附柱中，室温放置 2min，14,000×g 离心 2min。

相关产品信息

应用	相关产品	目录号
外泌体提取和纯化试剂盒		
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	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	外泌体提取和纯化试剂盒(血清/血浆)	EXORG20A-2/ EXORG10A-2
其它外泌体核酸提取纯化试剂盒		
外泌体 DNA 分离	外泌体提取和 DNA 分离试剂盒（血清/血浆）	EXODNA50A-1/ EXODNA30A-1
外泌体 DNA 分离	外泌体提取和 DNA 分离试剂盒(细胞培养上清/尿液)	EXODNA24B-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 RNA 分离	外泌体提取和 RNA 分离试剂盒（血清/血浆）	EXORNA50A-1/ EXORNA30A-1
外泌体 RNA 分离	外泌体提取和 RNA 分离试剂盒(细胞培养上清/尿液)	EXORNA24B-1/ EXORNA10B-1

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°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-iT™ 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。

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

