

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	4
样品的匀浆及打散	5
方案 1:外泌小体的富集	7
方案 2:外泌小体 RNA/DNA 纯化	7
常见问题回答	8

版本: 2024

简介

HiPure Exosome RNA/DNA Kit 适合于从各种生物样品中提取高纯度外泌体 RNA 和 DNA。试剂盒配套的基本 PEG 的外泌体沉淀剂和高效的硅胶柱纯化技术，可完成得到外泌体的总 RNA。得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern blot、poly-A+纯化、核酸保护和体外翻译等实验。该系列产品有 4 种规格，以满足不同需求。

原理

HiPure 硅胶柱以高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。

保质期

本产品可室温(15~25℃)可保存 18 个月。

组 成

HiPure Exosome RNA/DNA Kit

产品编号	R4319-01B	R4319-02B	R4319-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Exosome Precipitation Solution	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer GXP	10 ml	20 ml	90 ml
Buffer RWC*	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Proteinase K Solution	0.6 ml	1.2 ml	6.0 ml
RNase Free Water	10 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 低温(<12,000xg)小型离心机
- (可选：膜上 DNASE 处理) DNase Set
- 准备合适的匀浆工具(参考第 5-6 页)
- 用无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。
- 用无水乙醇稀释 Buffer RWC，并于室温保存。

方案 1. 外泌小体(Exosome)的沉淀富集

A. 从细胞培养液 (< 3ml) 中收集外泌小体

1. 转移细胞培养液至 5~50ml 离心管中, 4°C, 2,000 × g 离心 30 分钟去除细胞。
2. 转移上清液至新的离心管中, 加入 0.5 倍体积的 Exosome Precipitation Solution, 颠倒混匀 15-20 次, 2~8°C 放置过夜沉淀外泌小体。
3. 4°C, 10,000 × g 离心 1 小时收集外泌小体。
4. 小心倒弃上清液, 再短暂离心吸弃残液, 把外泌小体保存于-20°C或-80°C或直接按方案 2 抽提 RNA。

B. 从血清(<1ml)样品中收集外泌小体

1. 收集血清样品并保存于冰上待用。处理冻藏样品时, 25°C 水浴解冻后保存于冰上待用。4°C, 2,000 × g 离心 30 分钟去除细胞和细胞残片。
2. 转移上清液至新的离心管中, 加入 0.5 倍体积的 Exosome Precipitation Solution, 涡旋混匀。2~8°C 放置 30 分钟沉淀外泌小体。
3. 室温下, 10,000 × g 离心 10 分钟收集外泌小体。
4. 小心倒弃上清液, 再短暂离心吸弃残液, 把外泌小体保存于-20°C或-80°C或直接按方案 2 抽提 RNA。

C. 从血浆(<1ml)样品中收集外泌小体

1. 收集血浆样品并保存于冰上待用。处理冻藏样品时, 25~37°C 水浴解冻后保存于冰上待用。室温下, 2,000 × g 离心 20 分钟分离出血浆。
2. 转移血浆至新的离心管中。室温, 10,000 × g 离心 20 分钟去除细胞和细胞残片。
3. 转移上清液至新的离心管中。加入 0.5 倍体积 1 × Buffer PBS 稀释样品, 涡旋混匀。
4. 加入 0.5 倍体积的 Exosome Precipitation Solution 至稀释样品中, 颠倒混匀, 室温静置 10 分钟沉淀外泌小体。

5. 室温下，10,000 × g 离心 5 分钟收集外泌小体。
5. 小心倒弃上清液，再短暂离心吸弃残液，把外泌小体保存于-20℃或-80℃或直接按方案 2 抽提 RNA。

D. 从尿液(<2ml)样品中收集外泌小体

1. 收集尿液样品并保存于冰上待用。处理冻藏样品时，25℃水浴解冻后保存于冰上待用。4℃, 2,000 × g 离心 30 分钟去除细胞和细胞残片。
2. 转移上清液至新的离心管中，加入等倍体积的 Exosome Precipitation Solution 至上清中，颠倒混匀，室温放置 1 小时沉淀外泌小体。
3. 4℃, 10,000 × g 离心 1 小时收集外泌小体。
4. 小心倒弃上清液，再短暂离心吸弃残液，把外泌小体保存于-20℃或-80℃或直接按方案 2 抽提 RNA。

E. 从其它体液中收集外泌小体

1. 收集体液样品并保存于冰上待用。处理冻藏样品时，25℃水浴解冻后保存于冰上待用。2,000 × g 离心去除细胞和细胞残片。

体液类型	离心温度	离心时间
脑脊髓液	4 度	30 min
腹水	室温	30 min
羊水	4 度	10 min
奶	室温	10min

2. 转移上清液至新的离心管中。4℃, 10,000 × g 离心 20 分钟去除细胞和细胞残片。
3. 转移上清液至新的离心管中。
4. 按下表加入适量的 Exosome Precipitation Solution，涡旋混匀。静置沉淀外泌小体。

体液类型	Exosome Precipitation Solution	沉淀时间
脑脊髓液	等倍体积	2~8℃, 1 小时

腹水	0.5 倍体积	室温, 30 分钟
羊水	0.5 倍体积	室温, 30 分钟
奶	0.5 倍体积	室温, 30 分钟

5. 按下列条件, 10,000 x g 离心收集外泌小体。

体液类型	离心时间
脑脊髓液	2~8℃, 1 小时
腹水	室温, 10 分钟
羊水	室温, 10 分钟
奶	室温, 10 分钟

6. 小心倒弃上清液, 再短暂离心吸弃残液, 把外泌小体保存于-20℃或-80℃或直接按方案 2 抽提 RNA。

方案 2. 外泌小体总 RNA/DNA 抽提

1. 加入 100 μ l Buffer PBS 或灭菌水至外泌体沉淀中，涡旋或弹打让沉淀检散重悬。
2. 加入 20 μ l Proteinase K 和 300 μ l Buffer GXP，涡旋 5-10 秒打散沉淀，室温放置 20 分钟消化样品。
3. 加入 200 μ l 或 600 μ l 无水乙醇，涡旋 10 秒混匀。
若需要提取 miRNA，加入 600 μ l 无水乙醇至上清液中。
4. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中，转移混合液(不要超过 750 μ l)至柱子中。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
5. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子中。12,000 \times g 离心 30~60 秒。
6. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer RWC 至柱子中。12,000 \times g 离心 30 秒。
7. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000 \times g 离心 30 秒。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000 \times g 离心 30 秒。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。12,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。
10. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。加入 20~50 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。室温静置 5 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存-80 $^{\circ}$ C。

常见问题回答

该列表可能有利于您解决在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们，我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
离心后分层现象不明显	
加入 PCI 后混匀效果不好	加 PCI，一定要用手剧烈振荡混匀 15 秒。缓慢颠倒或涡旋会导致分层不明显或杂质的污染。如果离心后分层不明显，再剧烈混匀 15 秒后离心。
样品中含有有机溶剂	若样品含有有机溶剂如 DMSO，乙醇，强碱试剂，会影响分层。
柱子堵塞	
样品起始用量太多	减少样品用量。
低温离心	试剂盒中除特别指明，离心必须在室温下。低温离心，可能会导致沉淀的形成而引起柱子堵塞。设定离心机的温度为（15-25℃）。
RNA 产量低	
样品匀浆不充分	按第 5~6 页充分匀浆样品
样品起始用量太多	参照上面
RNA 的洗脱效率低	RNase Free Water 没有加到膜上，或洗脱体积不够。
培养液没有彻底去除	从细胞中提取 RNA 时，要把培养液彻底吸弃。
Buffer RW2 没有加入乙醇稀释	使用前，Buffer RW2 必须加入无水乙醇进行稀释
RNA 降解	
组织/细胞用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件。
RNA 酶污染	操作过程引入 RNA 酶的污染。
DNA 污染	
进行 DNase I 消化	增加 DNase I 膜上消化，确保 DNase I 消化液全部加到膜中央。
氯仿抽提振荡不够	加入氯仿后，用手剧烈上下振荡 15 秒。不要用涡旋或颠倒混匀。
下游实验结果不理想	
盐分污染	重复 Buffer RW2 洗涤一次。
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 10,000xg，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000xg 离心 2 分钟去除。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。