

## 目 录

简 介-----	2
原 理-----	2
试剂盒组成-----	3
保质期-----	3
准备工作-----	4
方案 1：外泌小体的富集-----	5
方 案 2 ： 外 泌 小 体 D N A 纯 化 -----	8
常见问题回答-----	12

版本: 2017-06

## 简介

HiPure Exosome DNA Kit 适合于从各种生物样品中提取高纯度总 DNA。试剂盒只需 40 分钟便可完成高纯度总 DNA 的提取工作。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

## 原理

HiPure 硅胶柱是采用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，可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如灭菌水)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

HiPure Exosome DNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在裂解液和蛋白酶作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入乙醇后，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer GW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer GW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、Southern blot 等实验。

## 保质期

HiPure Exosome DNA Kit，除 Carrier RNA 固体和 Proteinase K 干粉，其它组份可在室温下(15~25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2~8℃。低温下，Buffer ATL 可能会有沉淀形成，需 37℃ 水浴让沉淀完全溶解。Proteinase K 干粉和 Carrier RNA 室温运输，收到试剂盒后请保存于 -20℃。

## 组成

### HiPure Exosome DNA Kit

产品编号	D3119-01	D3119-02	D3119-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer ATL	6 ml	20 ml	100 ml
Buffer AL	6 ml	20 ml	100 ml
Buffer GW1*	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Carrier RNA	120 µg	310 µg	3 x 310 µg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml
Proteinase K	6 mg	12 mg	60 mg
Buffer AE	1.8 ml	15 ml	60 ml
Exosome Precipitation Solution	15 ml	60 ml	270 ml
说明书	1	1	1

### 需要准备材料和工具

- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。Proteinase K 干粉在 2-8℃ 保存一年，但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20℃。反复冻溶 Proteinase K 会影响其活性。冻藏保存过程中，Proteinase K 才会有沉淀析出，可在 37℃ 水浴 0.5~1 分钟让沉淀消失。
- 溶解 Carrier RNA(1µg/µl): 加入适量的 DEPC 处理水（自配）至 Carrier RNA。涡旋溶解，分装保存于-70℃。

## 方案 1. 外泌小体(Exosome)的沉淀富集

### A. 从细胞培养液 (< 10ml) 中收集外泌小体

1. 转移细胞培养液至 5~50ml 离心管中。4℃, 2,000 x 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** 至上清中, 涡旋混匀。2~8℃放置过夜沉淀外泌小体。
3. 4℃, 10,000 x g 离心 1 小时收集外泌小体。
4. 小心吸弃上清液, 把外泌小体保存于-20℃或-80℃或直接按方案 2 抽提 DNA。

### B. 从血清(< 4ml)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℃水浴解冻后保存于冰上待用。
2. 4℃, 2,000 x g 离心 30 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 0.2 倍体积的 **Exosome Precipitation Solution** 至上清中, 涡旋混匀。2~8℃放置 30 分钟沉淀外泌小体。
4. 室温下, 10,000 x g 离心 10 分钟收集外泌小体。
5. 小心吸弃上清液, 把外泌小体保存于-20℃或-80℃或直接按方案 2 抽提 DNA。

### C. 从血浆(< 3ml)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℃水浴解冻后保存于冰上待用。
2. 室温下, 2,000 x g 离心 20 分钟去除细胞和细胞残片。
3. 转移上清至新的离心管中。室温, 10,000 x g 离心 20 分钟去除细胞和细胞残片。
4. 转移上清液至新的离心管中。加入 0.5 倍体积 1 x Buffer PBS 稀释样品, 涡旋混匀。

5. 加入 0.2 倍体积的 **Exosome Precipitation Solution** 至稀释样品中，涡旋混匀。
6. 室温静置 10 分钟沉淀外泌小体。
7. 室温下，10,000 x g 离心 5 分钟收集外泌小体。
8. 小心吸弃上清液，把外泌小体保存于-20℃或-80℃或直接按方案 2 抽提 DNA。

#### D. 从尿液(<10ml)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。
2. 4℃，2,000 x g 离心 30 分钟去除细胞和细胞残片。
3. 转移上清液至新的离心管中，加入等倍体积的 **Exosome Precipitation Solution** 至上清中，涡旋混匀。
4. 室温放置 1 小时沉淀外泌小体。
5. 4℃，10,000 x g 离心 1 小时收集外泌小体。
6. 小心吸弃上清液，把外泌小体保存于-20℃或-80℃或直接按方案 2 抽提 DNA。

#### 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. 2,000 x 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

3. 转移上清液至新的离心管中。4℃，10,000 x g 离心 20 分钟去除细胞和细胞残片。
4. 转移上清液至新的离心管中。

5. 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	0.2 倍体积	室温，30 分钟
奶	0.5 倍体积	室温，30 分钟

6. 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

7. 小心吸弃上清液，把外泌小体保存于-20℃或-80℃或直接按方案 2 抽提 DNA。

## 方案 2. 外泌小体总 DNA 抽提

1. **涡旋松散沉淀**，加入 200μl Buffer ATL 或灭菌水至外泌小体沉淀物中。用移液枪反复吸打打散沉淀。
2. **加入 10μl Proteinase K 和 200μl Buffer AL 至样品中**。涡旋 15 秒混匀，56℃ 水浴 30 分钟。  
若血液小于 10 μl 或样品中核酸含量很低，推荐加入 3μl Carrier RNA 至样品中。
3. **加入 200μl 无水乙醇**，涡旋 15 秒混匀。室温静置 3 分钟。
4. 短暂离心收集管壁上的液滴。
5. 把 DNA 柱装在收集管中。**转移混合液至柱子中**。6,000 x g 离心 30~60 秒。

6. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 $\mu$ l Buffer GW1**(已用乙醇稀释)至柱子中，**6,000  $\times$  g** 离心 **30~60 秒**。  
Buffer GW1 使用之前，须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示。
7. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 600 $\mu$ l Buffer GW2**(已用乙醇稀释)至柱子中，**6,000  $\times$  g** 离心 **30~60 秒**。  
Buffer GW2 使用之前，须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示。
8. (可选)倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 600 $\mu$ l Buffer GW2**(已用乙醇稀释)至柱子中，**6,000  $\times$  g** 离心 **30~60 秒**。
9. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**13,000  $\times$  g** 离心空柱 3 分钟以甩干柱子。
10. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 15~50 $\mu$ l 预热至 56 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央**。静置 3 分钟。**13,000  $\times$  g** 离心 1 分钟。  
DNA 微量柱最小的洗脱体积是 15 $\mu$ l。小于 15 $\mu$ l 会导致 DNA 的洗脱效率下降。第一次可洗脱出 50~70% DNA。若需获得最高产量，可加入 15~50 $\mu$ l Buffer AE 至柱子的膜中央，进行第二次洗脱。
11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。

## 常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 的技术人员可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，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
<b>DNA 产量低</b>	
样品 DNA 含量低	组织样品本身含量低
柱子堵塞	若样品消化后仍在明显的颗粒，于 10,000 xg 离心 5 分钟去除未消化的物质。
洗脱液体积不够或洗脱液没有加到膜上	增加洗脱体积和洗脱次数。洗脱液必须全部加到柱子的膜中央。
Buffer GW1/GW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇至 Buffer GW1 和 Buffer GW2 中。
柱子没有空甩	柱子必须空甩 2-3 分钟以去除膜上残留的乙醇。
<b>RNA 污染</b>	
加入 RNASE 消化	样品经 Buffer ATL 或 Buffer AL 消化后，加入 RNase A 消化去除 RNA
<b>OD260/OD280 比值不正常</b>	
RNA 污染	加入 RNase 酶消化，或延长 RNASE 酶的消化时间
Proteinase K 活性下降	重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须立即保存于-20℃。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。
加入 Buffer AL 后混匀不充分	重新提取，加入 Buffer AL 后立即颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer AL 充分混匀。
Buffer DW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。

