

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 纯化	7
常见问题回答	12

版本: 2015-01

简介

HiPure Exosome RNA Kits 适合于从各种生物样品中提取高纯度总 RNA。试剂盒结合高效 Magzol Reagent 一步法抽提试剂和硅胶柱纯化技术, 只需 40 分钟便可完成高纯度总 RNA 的提取工作。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

本产品除 Buffer PCI2 外, 其它组份室温(15~25℃)可保存 18 个月。Proteinase K 干粉室温运输和保存, 长期保存建议保存于-20~8℃, 溶解后的 Proteinase K 需保存于-20~8℃。Buffer PCI2 室温运输, 收到产品后保存于 2~8℃。

组 成

HiPure Exosome RNA Kit

产品编号	R4319-01	R4319-02	R4319-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Exosome Precipitation Solution	15 ml	60 ml	270 ml
Proteinase K	12 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
RTL Lysis Buffer	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer PCI2	10 ml	60 ml	200 ml
Buffer RWC*	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	10 ml	30 ml	100 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。
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml, 轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉可在室温下保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20~8℃。

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°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. 小心吸弃上清液，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。
2. 4°C, 2,000 × 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 0.5 倍体积的 Exosome Precipitation Solution 至上清中，涡旋混匀。2~8°C 放置 30 分钟沉淀外泌小体。
4. 室温下，10,000 × 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°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。
2. 室温下，2,000 × 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 × 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 × Buffer PBS 稀释样品，涡旋混匀。
5. 加入 0.5 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 × 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 RNA。

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 × 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 × 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 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. 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

3. 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。
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	0.5 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 × 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 RNA。

方案 2. 外泌小体总 RNA 抽提

1. 涡旋松散外泌体沉淀。加入 400 μ l RTL Lysis Buffer 至沉淀物中，涡旋打散沉淀或用移液枪吸打几次。
2. 加入 200 μ l RNase Free Water 和 20 μ l Proteinase K 至重悬液中，55 $^{\circ}$ C 振荡温育 15 分钟让沉淀物完全溶解。
3. 加入 600 μ l Buffer PCI2 至混合液中，涡旋混匀 15 秒，室温静置 3 分钟。
4. 4 $^{\circ}$ C，12,000 \times g 离心 15 分钟。
5. 小心转移上清液至新的离心管中，加入 2 倍体积无水乙醇。涡旋 10 秒混匀。

以下离心均在室温下进行。

5. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。12,000 \times g 离心 30 秒。
6. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子中。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 RWC(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。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。
10. 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。
11. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。加入 15~30 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 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。