

Exosome RNA Purification Kit 说明书

Cat.No.:EZB-exo-RN1

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读本说明书，以保证操作正确

产品组分

组分	EZB-exo-RN1 (50 Preps)
Lysis Buffer	30 ml
Buffer A	12 ml
Supplemental Reagent	550 μ l
Wash Buffer 1*	8 ml
Wash Buffer 2*	8 ml
Elution Buffer	10 ml
Spin Columns for RNA (with Collection Tubes)	50 Preps

注：*1. Wash Buffer 1和Wash Buffer 2首次使用前须加入32 ml的无水乙醇并充分混匀，并在加入无水乙醇后在瓶身做好标记。

注意

1. Wash Buffer 1和Wash Buffer 2首次使用前须加入32 ml的无水乙醇并充分混匀（Wash Buffer 1和Wash Buffer 2与无水乙醇的体积比为1:4），并在加入无水乙醇后在瓶身做好标记。
2. Elution Buffer使用前建议分装为3~4份保存，以防污染。
3. 本试剂盒中离心的过程都是在4°C的离心机中进行，其余的操作步骤都是在室温中进行，所以实验前需提前预冷离心机。
4. 本试剂盒提取的外泌体总RNA中包含了microRNA、lncRNA、circRNA和mRNA，可用于RT-qPCR，测序、芯片等实验。

保存条件

Lysis Buffer 和 Buffer A 需 2~8°C 避光保存，Supplemental Reagent 需 -20°C 保存，其余组分室温保存（注：Buffer A在4°C保存时会出现结晶或冻结现象，仅需在使用前置于室温融化后使用即可，不影响使用）。有效期12个月。

样品裂解

1. 取10~100 μ l的外泌体置于1.5 ml EP管中，加入500 μ l Lysis Buffer（对于外泌体纯化，建议使用超过0.5 ml的血清/血浆或超过10 ml的细胞培养基）。
2. 用移液器吹打10~20次充分混匀后，室温静置5 min，以充分裂解外泌体。
3. 加入150 μ l Buffer A，用手快速剧烈振荡混匀15 sec（不建议涡旋混匀），室温静置3~5 min。
4. 15000 g（约13000 rpm），4°C离心3~5 min，将上清液转移至新的1.5 ml EP管中（吸取上清液时不要吸到中间层和下层液体，以免造成杂质残留）。

RNA结合（过柱）

5. 向吸出的上清中加入Supplemental Reagent（补充试剂）10 μ l，充分混匀后再加入上述溶液（上清液+补充试剂）总体积1.6倍的无水乙醇，充分混匀（如果加入无水乙醇后出现沉淀，建议用移液器吹打至沉淀不可见为止）；然后将上述混合液转移至RNA离心吸附柱（Spin Column）中，4000 g（约6500 rpm），4°C离心1 min，弃去液体。倒掉流出液后，可以将收集管口朝下，用吸水纸将收集管口残留的液体吸干净。

洗涤

6. 加入500 μ l Wash Buffer 1到离心柱中，12000 g，4°C离心1 min；小心取出离心柱，倒掉流出液，用吸水纸将收集管口残留的液体吸干净（注意：将离心柱从收集管中取出时，应小心操作，防止离心柱底部接触到液体）。
7. 加入500 μ l Wash Buffer 2，12000 g，4°C离心1 min（洗柱）。倒掉废液，用吸水纸将收集管口残留的液体吸干净。
8. 将离心柱放回收集管，12000 g，4°C离心1 min，以充分去除残留的废液。
9. 弃去收集管，将离心柱转移至无RNase的1.5 ml EP管中，开盖晾干2 min。

RNA洗脱

10. 将Elution Buffer 提前预热到60°C，吸取30~50 μ l加入离心柱中央的膜上，然后将上述套有离心柱的EP管在60°C的水浴锅或者金属浴中放置3 min。
11. 12000 g，4°C离心1 min（可选操作：在初次洗脱离心后，可以将液体加回离心柱，再放置5 min，使RNA充分溶解后再离心，能增加RNA产量）。弃去离心柱，离心产物即为RNA，可以直接进行后续实验，或储存于-80°C备用。

RNA浓度测定

对于常规的RNA样品，浓度和纯度通常可以使用紫外分光光度计测定，如Nanodrop等；但是，对于少量RNA（如从外泌体中提取的RNA）的浓度和纯度测定，需要使用Agilent 2100 Bioanalyzer或Qubit来测定。

通常建议直接取等量样品提取外泌体，然后用本试剂盒提取RNA，然后直接取等体积的RNA进行逆转录和qPCR测试即可。

实验流程

样品裂解

10~100 μ l 外泌体在500 μ l Lysis Buffer中裂解；室温放置5 min，加入150 μ l Buffer A混匀静置3~5 min

4°C, 15000 g离心3~5 min

小心地将上清液转移到新的离心管中

向上清液中加入补充试剂10 μ l，充分混匀后再加入上述溶液总体积1.6倍的无水乙醇，充分混匀

RNA结合（过柱）

将上述混合物加入离心柱中

4°C, 4000 g离心1 min

洗涤

用Wash Buffer 1洗1次，Wash Buffer 2洗1次（每次500 μ l），空柱离心1次

每次4°C, 12000 g离心1 min

RNA洗脱

将离心柱转移至新的EP管中，开盖晾干2 min；加入30~50 μ l 预热到60°C的Elution Buffer到离心柱中央的膜上

60°C条件下放置3 min；4°C, 12000 g离心1 min；弃去离心柱，离心产物即为RNA

Exosome RNA Purification Kit Trouble Shooting

1、RNA产量过低，或用已经验证过的引物检测基因表达，检测到的内参基因Ct值偏大，或无法做出正常的扩增结果。

解决办法：

a.检查所使用的试剂是否受到污染：可与未使用过的产品作对照，比较两组结果是否一致。建议试剂盒开封后，每种Buffer分装为2份（可用15、50 ml离心管分装），每次使用时应严格按照规范操作，防止交叉污染。

b.溶解好的引物应该分装为小份冻存，以减少引物降解及降低污染的可能性。

c.检查操作流程是否正确。例如：

1.RNA提取的整个过程在4°C条件下进行。

2.Wash Buffer使用前需加入标签所示体积的无水乙醇混匀才可使用。

3.对于外泌体RNA纯化，外泌体应从超过0.5 ml的血清/血浆或超过10 ml的细胞培养基中分离。

4.外泌体裂解产物加Buffer A混匀静置离心后，吸取上层液体时不要吸到中间层和下层液体，以免造成杂质残留。

5.向上清液中加入补充试剂10 μ l，充分混匀后再加入上述溶液总体积1.6倍的无水乙醇，充分混匀后转移至到柱子中。

6.洗涤时需用12000 g高速离心充分去除Wash Buffer，然后空柱离心一次，然后开盖晾干2 min（此步骤可防止Wash Buffer残留在柱上）。

7.洗脱液应加入柱子中央的膜上，体积可以根据需要在一定范围内调整（一般30~50 μ l，不可少于20 μ l，否则无法充分溶解RNA），以浓度满足后续实验需求为宜。重复洗脱一次及延长放置时间至5 min均可提高RNA产量。

2、关于RNA浓度测定

1.对于常规的RNA样品，浓度和纯度通常可以使用紫外分光光度计测定，如Nanodrop等。

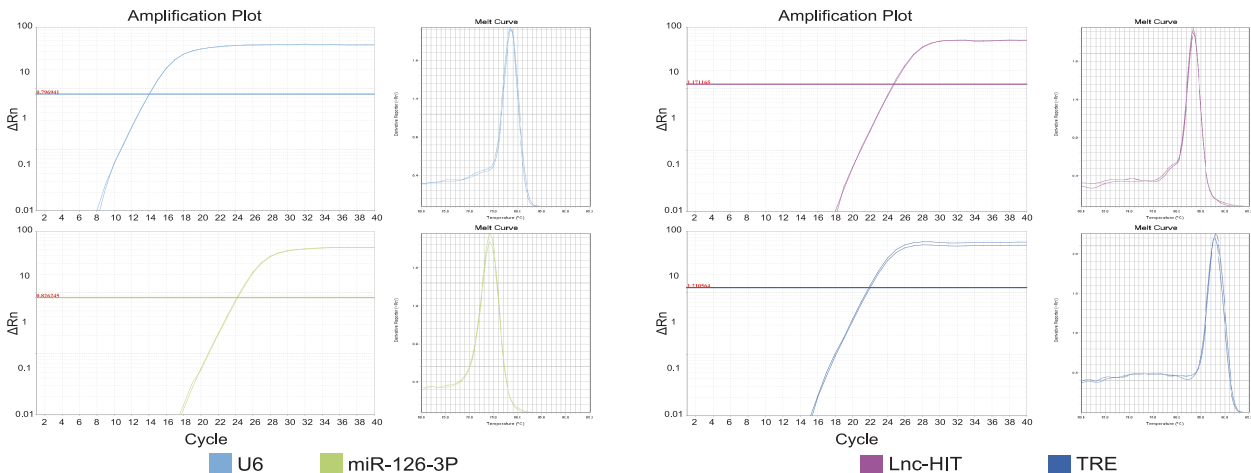
2.对于少量RNA（如从外泌体中提取的RNA）的浓度和纯度测定，可以使用Agilent 2100 Bioanalyzer或Qubit来测定。

3.对于非常微量的RNA（如显微操作提取的组织，或者从血浆、血清中直接提取的RNA），可以直接用RT-qPCR进行检测。

4.对于外泌体RNA的检测，通常建议直接取等量样品提取外泌体（可用EZB-exo1，EZB-exo2等），然后取等量外泌体使用本试剂盒提取RNA，最后取等体积的RNA进行逆转录和qPCR检测即可。

代表性实验结果

本试剂盒用于提取293T细胞培养上清液中的外泌体RNA后，检测miRNA和lncRNA的表达结果请见下图：



由上述qPCR的检测结果可见，本试剂盒能够很好的用于miRNA和lncRNA的提取。