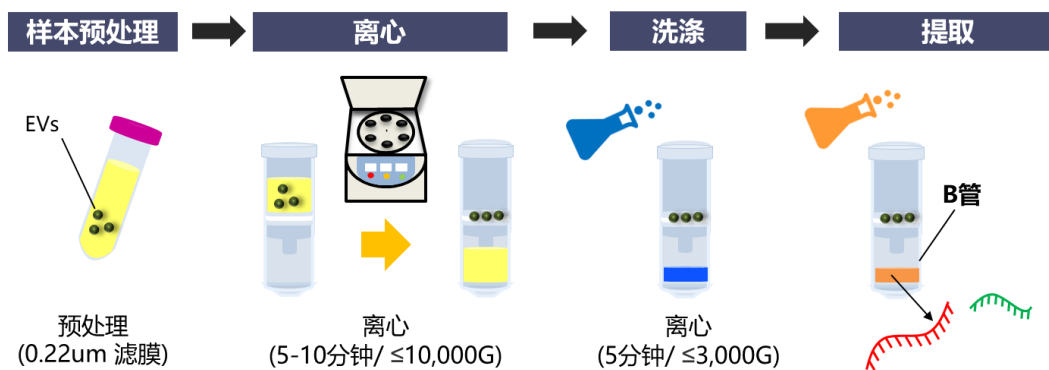
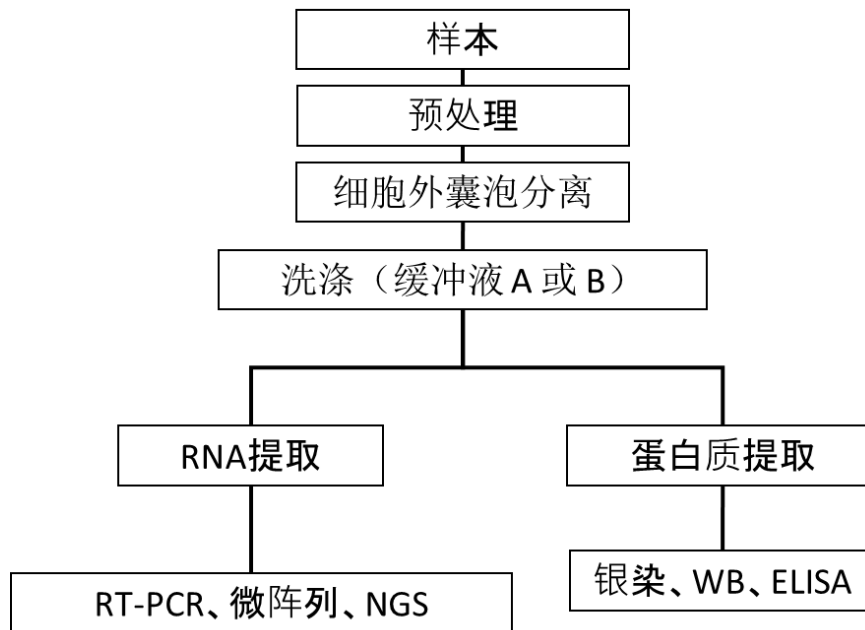


EVAGLAX™ 使用方法

(适用产品：SC-B-730-00-00)

1. EVAGLAX™ 的使用概述



2. 产品组成



商品	20 次检测	100 次检测
离心柱	20 件	100 件
收集管 (1.5mL)	20 件	100 件
洗涤缓冲液 A	10mL	50mL
洗涤缓冲液 B	10mL	50mL

3. 本试剂盒以外的、需要额外准备的耗材

类别	耗材种类	产品名	厂家	型号
通用	0.2 μ m Pre-filter	Minisart Syringe Filter 0.2 μ m	Sartorius	S6534FMOSK
通用	1mL Syringe	-	-	-
通用	1.5mL low protein adsorption tube	-	-	-
通用	2.0mL low protein adsorption tube	-	-	-
对于 RNA	miRNeasy	miRNeasy Micro Kit	QIAGEN	217084
对于蛋白质	M-PER	Mammalian Protein Extraction Reagent	Thermo Fisher Scientific	78501

1. 保存条件

将试剂盒存放在 2-10°C 的冷藏环境中。

2. 使用目的

本产品仅供研究使用。请不要将本产品用于人类或动物的医学或临床诊断。

3. 细胞外囊泡分离步骤

【样品制备过程】

- 如果标本已冷冻，请确保在 4°C 下解冻。
- 使用 0.2 μm 滤膜过滤样品
- *如果标本粘度高或者含有大量碎屑，建议先进行粗离心 10,000 G / 30 min，然后用 0.2 μm 滤膜过滤上清液。粗离心时，建议取上清后留 150 μL 。

【细胞外囊泡捕获过程】

- 将 100-500 μL 样品添加到离心柱中。
- 以 6,000G 离心 10 分钟。（如果转速不足，追加 10,000G/3 分钟离心）
- *如果担心样品堵塞，请将离心机的温度设置为 25°C。
- 丢弃含有流出液的外管，将内管插入一个新的 1.5 mL 低蛋白吸附的收集管。
（*如果样品中有杂质，可选择追加以下操作：
- ①样品中的杂质略高的情况
 - 向离心柱中加入 100 μL 洗涤缓冲液 A，并以 3,000 G/5 分钟离心。
 - 丢弃含有流出液的外管，将内管插入一个新的 2mL 低蛋白吸附的收集管。
- ②样本中的杂质含量高的情况
 - 将 300 μL 洗涤缓冲液 B 放入离心柱并以 3,000 G/5 分钟离心。
 - 丢弃含有流出液的外管，将内管插入一个新的 2mL 低蛋白吸附的收集管。

4. 细胞外囊泡裂解步骤

【蛋白质提取工艺】

- 向离心柱中加入 100 μL M-PER，并以 500G/1 分钟离心。
- *请勿丢弃流出液。使用 2.0 mL 低蛋白吸附的收集管，无需更换。
- 在室温下保持 5 分钟。
- 以 6,000G/5 分钟离心。（或者 10,000G/3 分钟，视情况而定）
- 收集管中的液体即是样品。

【RNA 提取过程】

- 向离心柱中加入 500uL QIAzol 并以 500G/1 分钟离心。
- *请勿丢弃流出液。使用 2.0 mL 低蛋白吸附的收集管，无需更换。
- 在室温下放置 5 分钟。
- 以 6,000G/5 分钟离心。（或者 10,000G/3 分钟，视情况而定）
- 将离心得到的液体转移到新的 1.5 mL 低蛋白吸附管中。不需要离心柱。
- 加入 140uL 氯仿，涡旋搅拌 15 秒，室温放置 3 分钟。
- 在 4°C 下以 12,000 G 离心 15 分钟，样品分成 3 层。顶部透明层是含有 RNA 的水层，请吸出 280 μ L 透明层，注意避免混入下面的白色和红色层，然后转移到另一个 1.5 mL 管中。
- 添加 1.5 体积的 100% EtOH（即 420 uL），并通过移液器搅拌。

-----以下是 mirNeasy 的操作步骤-----

- 将 700uL（尽可能多）样品转移到 RNeasy MinElute 离心柱中，轻轻盖上盖子，然后在 8,000G 下离心 15 秒。丢弃流出液。

（*如果需要用于 NGS，此时需进行 DNase 处理。使用 RNase-Free DNase Set (QIAGEN)。

添加 350uL Buffer RWT \Rightarrow 8,000G, 15 分钟

\Rightarrow 加入 DNase 反应 10 分钟

\Rightarrow 添加 350uL Buffer RWT \Rightarrow 8,000G, 15 分钟

请注意，如果实施此操作，则无需使用 700uL BufferRWT 进行后续清洗。）

- 向离心柱中加入 700uL Buffer RWT，轻轻盖上盖子，8,000G 离心 15 秒。丢弃流出液。
- 向离心柱中加入 500uL Buffer RPE，轻轻盖上盖子，8,000G 离心 15 秒。丢弃流出液。
- 向离心柱中加入 500uL 80% EtOH，慢慢盖上盖子，8,000G 离心 2 分钟。连同流出液一起将收集管丢弃。
- 将 RNeasy MinElute 离心柱放入新的收集管（2 mL）。
- 以最大速度 (>12,000G) 离心 5 分钟，同时打开柱盖使其干燥。
- 将 RNeasy MinElute 离心柱放入新的收集管（1.5 mL）。向离心柱中加入 14uL 无 RNase 水（小容器）（注意不要粘在壁上！避免移液器吸头接触到滤膜！），慢慢盖上盖子，以最大速度 (>12,000G) 离心 1 分钟提取 RNA。

(*流出液即为样品)

Document Revision History

Date	Ver	Changes
June 2020	1.3	Create new
September 2020	1.4	Updated text
October 2020	1.5	Updated text
October 2020	1.6	Updated text
February 2021	1.7	Updated text
March 2021	1.8	Updated text
June 2021	2.0	Updated text
July 2021	3.0	Updated text
January 2022	4.0	Updated text EVAGLAX™
February 2022	4.1	Updated Fig.
March 2022	4.2	Updated text
November	4.3	Updated text

AGC Inc.

Business Development Division, Incubation Group
1-5-1 Marunouchi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8405 Japan
E-mail. agc-ml.evaglax.info@agc.com