

## 【产品名称】

Exosupur®外泌体纯化袖珍柱

货号：ES9016

## 【产品简介】

本试剂盒主要适用于外泌体的 post-mature 修饰（荧光染色、抗体标记，以及小分子、大分子生物偶联装载等）后的进一步纯化，或者其他方法得到的外泌体的进一步纯化试剂盒。本试剂盒结合了分子筛 SEC 和多模式吸附功能为一体的原理进行外泌体分离和二次纯化，具有纯度高、回收率高、高效除杂、可重复性强、外泌体完整性好、操作简单、对设备要求低等优点。可在 40min 内完成外泌体的分离纯化。提取的外泌体产物质量稳定可靠、蛋白污染程度低，可用于蛋白提取分析、RNA 提取分析、细胞功能检测等下游生物学实验。

## 【规格和组成】

6 根/盒

组分名称	数量
Exosupur®袖珍柱*	6 根
离心柱外管	6 份
下盖	6 份
说明书	1 份

## 【实验室自备试剂及仪器】

1. 缓冲液：PBS
2. 封柱液：20%乙醇（体积比）
3. 清洗液：1M NaOH 含 30%异丙醇（体积比）
4. 收集管(1.5ml/2ml EP 管)
5. 样品(上样前需平衡到室温，建议单个柱子单次上样体积为 100μl，最大上样体积不超过 500μl，不同上样体积的回收率、除杂率参考结果展示图 1-2)
6. 仪器：旋转混合仪，微量离心机，常温离心即可

## 【保存和运输】

常温运输，收到试剂盒后请于 4°C-30°C 直立存放，有效期 12 个月。

## 【操作步骤】

### 1. 样本预处理

二次纯化样本无需预处理，样本为进行了荧光染色或抗体孵育标记等 post-mature 修饰的外泌体，或者其他方法得到的外泌体溶液。

其他类型样本预处理，可参考文献或联系 techservice@ecobiotech.com。

### 2. 袖珍柱预处理

①将 Exosupur®离心柱取出后，拧断柱子尾部并拧下螺旋盖子。将柱子放回离心柱外管中。

②500×g 离心 30s 去除储存液。

③向柱子中加入 600μl PBS 缓冲液。

④500×g 离心 30s 清洗柱子，弃去外管中的废液。

⑤重复步骤③和 ④两次。

### 3. 样品纯化

①将柱子置于一个收集管（EP 管）中。

②将柱子下盖盖上后，加入 100μl 样品（样品如果体积不足 100μl，建议使用缓冲液将样品体积补足到 100μl，可依据具体需求增大上样体积，最大不能超过 500μl）。

③将螺旋盖子盖上拧紧；将柱子放置在旋转混匀仪上，室温下 80rpm 混合 30 min。

④取下下盖将柱子放入新的 EP 管中，500×g 离心 30 秒，收集流出液 E1。

⑤可选步骤：将柱子放入新收集管（EP 管），拧下螺旋盖子，加入 100μl 缓冲液，500×g 离心 30s，收集流出液 E2；分别检测 E1、E2 浓度，如欲最大限度地提高外泌体的回收率可混合 E1E2。

\*尽可能保证离心柱内湿润状态，离心后立即加液，如果不立即再生可先加入缓冲液将下盖和螺旋盖子盖上拧紧暂时储存。

### 4. 柱床再生

①将柱子放回离心柱外管中，向柱子中加入 600μl PBS 缓冲液。

②500×g 离心 30s 清洗柱子，弃去外管中的废液。

③重复步骤 ①和 ②两次，注意将盖子上的填料转移至柱子中。

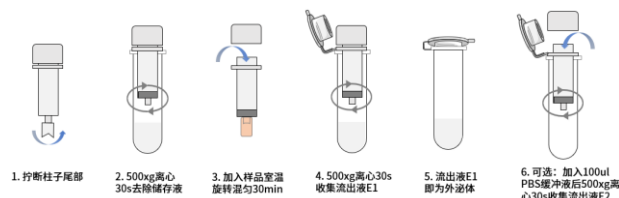
④盖上下盖，向柱子中加入 600μl 清洗液，将螺旋盖子盖上拧紧，放置在旋转混匀仪上，混匀 30min。

⑤取下下盖，500×g 离心 30s 彻底清洗柱子，弃去外管中的废液。

⑥向柱子中加入 600μl PBS 缓冲液，500×g 离心 30s 清洗柱子，弃去收集管中的废液。重复多次直至洗到中性。

⑦向柱子中加入 600μl 封柱液，500×g 离心 30s，弃去外管管中的废液。将柱子下盖盖上后，再加入 600μl 封柱液，将螺旋盖子盖上拧紧 4°C-30°C 直立存放储存，建议每根柱子重复使用次数不超过 5 次。

## 【操作流程示意图】



## 【结果展示】

### 1. 颗粒回收率

对不同体积荧光孵育改造后的外泌体进行上样收集 E1 和 E2，通过纳米流式测定颗粒数，如图 1 所示。上样 100-200μl 时，Exosupur®袖珍柱颗粒回收率相对较高，E1 高达 60%以上颗粒回收率。

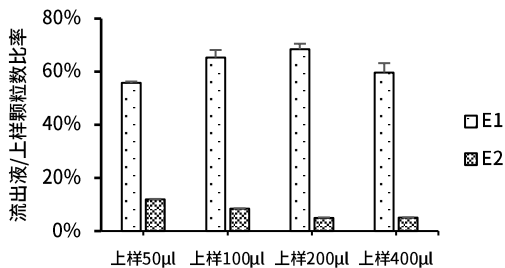


图1. Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱纯化荧光外泌体的效果

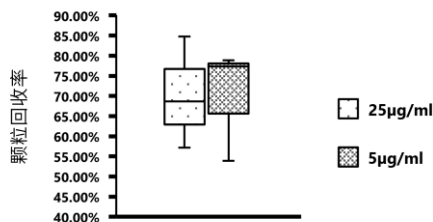


图4. Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱使用次数对颗粒回收率的影响

## 2. 杂质去除率

对不同体积的荧光标记外泌体进行上样收集 E1 和 E2 通过酶标仪测定荧光值计算游离染料去除率如图 2 所示。上样 50-100µl 时，Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱游离染料去除率相对较高，E1 游离染料去除率超过 99% 以上，随上样体积增加游离染料去除率会略微降低。

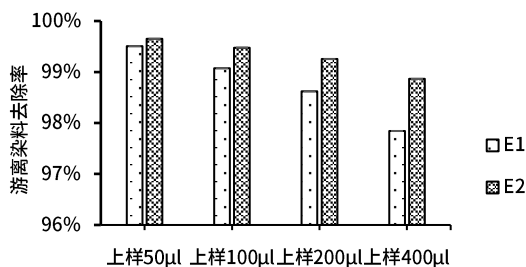


图2. Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱纯化荧光标记外泌体的游离染料去除率

## 4. 三阳一阴外泌体标志物检测

通过 WB 对 3 个外泌体 marker 阳性蛋白和 1 个纯度指示阴性蛋白进行分析，表明经过 Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱回收的外泌体不影响 WB 三阳一阴表征。

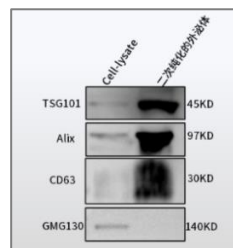


图5. Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱纯化样本三阳一阴外泌体标志物分析

## 3. 荧光染料浓度和重复使用次数对杂质去除率和颗粒回收率影响

考虑到荧光染料标记外泌体进行体内外示踪是外泌体科研工作者几乎都要涉及的实验，但常规使用超滤等方法去除游离荧光染料时效果不佳，游离染料残留较多。我们将荧光染料标记外泌体后进行 Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱二次纯化的一些参数进行了进一步测试，主要测试了亲脂性荧光染料浓度是否影响游离染料去除效果，和重复使用是否影响颗粒回收率。

以不同浓度染料 (2µg/ml-200µg/ml) 分别上样 100µl 到 Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱，收集 E1，酶标仪检测染料原液和回收液 E1 的荧光值，计算染料去除率，如图 3 所示。可见，染料浓度在 10µg/ml 以上时，Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱的游离染料去除率稳定在 98-99% 以上。

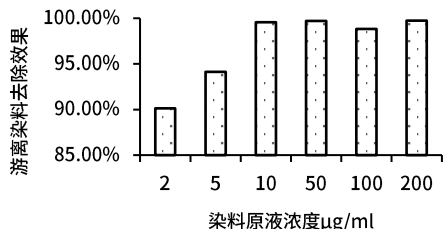


图3. 不同浓度荧光染料上样对 Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱杂质去除率的影响

分别使用 5µg/ml 和 25µg/ml 的亲脂性荧光染料标记外泌体后，上样 100µl 到 Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱，收集 E1，通过纳米流式测定颗粒数，计算颗粒回收率，将 Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱再生后继续重复几次实验，如图 4 所示。可见，不管使用低浓度还是中高浓度荧光染料标记的外泌体，使用 Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱进行几次重复实验，颗粒回收率相对稳定，约在 60% 以上。

## 5. 电镜 TEM 检测

经过 Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱回收的外泌体不影响外泌体的形貌特征。

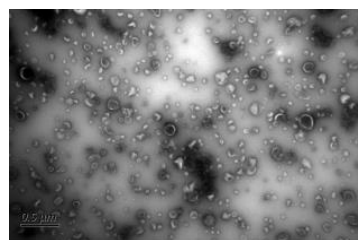


图6. Exosupur<sup>®</sup>袖珍柱二次纯化后的 TEM 电镜分析

【使用前请微信扫码观看操作示范】



【生产企业】北京恩泽康泰生物科技有限公司

单位地址：北京市大兴区宝参南街华润生命科学园 1 号楼 108

邮编：102609

电话/传真：010-69739599

邮箱：techservice@ecobiotech.com

公司网址：http://www.ecobiotech.com