

【产品名称】

Exosupur®外泌体纯化试剂盒

货号: ES9P14e

【产品简介】

本试剂盒是专门用于从血浆、血清等复杂液体样本中提取细胞外囊泡的纯化试剂盒。试剂盒采用分子排阻色谱的原理,根据被分离组分的分子大小实现外泌体的分离。本试剂盒具有快速、高效、操作简单、对设备要求低等特点,可在 60min 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、细胞功能检测等生物学实验。

【规格和组成】

组分名称	数量
Exosupur®排阻柱	4 根
说明书	1 份

*每根柱子单次可处理 1ml 样本,可重复使用 5 次,共计可处理 20ml。

【实验室自备试剂及注意事项】

1. 无菌 PBS 溶液(须用 0.22µm 滤膜过滤,建议新鲜配置或采购已过膜的 PBS, 4°C 冰箱保存的 PBS 溶液需先平衡至室温);
2. 封柱液: 20%无水乙醇(须超声条件脱气 20min 或配置好后静置过夜);
3. 超滤管(截留分子量 100kD);
4. 收集管(2ml EP 管和 15ml 离心管);
5. 样品(上样前需平衡至室温,单根柱子单次上样体积为 1ml);
6. 自备材料: 铁架台,用于固定排阻柱,便于加样操作。
7. 请注意使用过程中勿将柱子从高处掉落或摔打,以免导致柱床碎裂,如出现上述原因导致的柱床碎裂现象不能享受退换货服务。

【保存和运输】

常温运输,收到试剂盒后请于 4°C 直立存放,有效期 12 个月。

【操作步骤】**1. 样本预处理**

样本预处理可在下步柱平衡期间同时进行,首次操作建议先做好样本预处理再进行纯化操作。

血浆/血清: 获得血清/血浆后, 1500g (4°C) 离心 20min 取上清, 3000g

(4°C) 离心 15min 取上清,再用 0.8µm 滤膜过滤,过滤后上 Exosupur®排阻柱进行分离。

注: 血浆/血清样本成分复杂,如果想进一步获得更高纯度的外泌体样本,可联合超速离心等方法提高外泌体纯度。

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

2. 柱平衡

①将 Exosupur®排阻柱从 4°C 冰箱取出,可用铁架台等进行垂直固定。

②实验前先将排阻柱室温放置 30min 以上,使柱子温度充分平衡到室温 (18°C-25°C)。温度过低或过高,影响分离效果。

③将废液收集管(普通离心管或者烧杯即可)放置于排阻柱下方,取下柱子顶盖,弃去筛板上方的封柱液(直接倒掉或者用移液器吸去)。取下柱子底部的底盖,并从顶部加入不少于 10 ml 的 PBS 冲洗柱子*。冲洗过程中,顶部筛板必须保持湿润,避免柱子变干。(流速约为 2min30s-3min/500µl)。冲洗完成后,盖上底盖,可直接上样或加入 1ml PBS 备用。

*冲洗完成后,若发现上筛板和柱床中间出现 0.1cm 左右空隙,属于正常现象,不影响分离效果;若空隙过大,可使用吸头顶端将筛板轻轻往下推至填料上表面。

注意事项: 尽量使用当天新配的 PBS 用 0.2µm 滤膜过滤,或采购的已过膜的 PBS,避免引入微生物及化学颗粒污染。如果使用 4 度冰箱保存的 PBS 溶液,必需平衡到室温,否则有可能在柱子中引入大量气泡。

3. 样品上样

①取下排阻柱底盖,用移液器吸去上筛板上面的 PBS,加入室温平衡好的 1ml 样品。(注意:若样品不足 1ml,建议加 PBS 补至 1ml,再混匀上样,避免因上样体积小造成的外泌体馏分偏移)。

②待样品全部进入筛板,底部出口无液体流出后,开始加洗脱液即 PBS (建议每次添加 500µl 洗脱液,待上一个 500µl 洗脱液全部进入排阻柱内后,再添加下一个 500µl 洗脱液),用收集管(1.5ml 离心管)收集流出液,从第一滴流出液开始计算,每 500µl 流出液记为 1 个馏分。

4. 外泌体收集

①**高回收率收集方案:** 收集前 5 个外泌体馏分(即馏分 1, 2, 3, 4, 5), 每个馏分 500µl。(注意:如不区分馏分可直接加入 2.5ml PBS 洗脱到一个收集管里,以减少加样和收样操作步骤)。

②**高浓度外泌体收集方案:** 弃去前面的 2 个馏分共 1ml,只收集外泌体浓度最高的 3, 4 馏分,每个馏分 500µl。(注意:如不区分馏分可直接加入 1ml PBS 洗脱到一个收集管里,以减少加样和收样操作步骤)。

③**高纯度外泌体收集方案:** 只收集前 4 个馏分(即馏分 1, 2, 3, 4)共计 2ml;如果有更高的纯度要求比如拍摄电镜,建议添加 600µl 洗脱液,全部进入排阻柱内后,再添加 200µl 洗脱液,弃去前面的 600µl,收集后面的 200µl 馏分进行电镜制样。

④对于说明书中包含的样本类型,可以按上述步骤进行外泌体收集;如果用非常规样本进行实验,因为样品粘稠度等因素可能会影响外泌体组分在排阻过程中的动态分布,建议在正式实验前使用荧光纳米微球(100nm)添加至您的样品中,进

行预实验标定荧光微球的分布。标定过程中每 500μl 流出液作为一个馏分，收集 10 个馏分，使用 Qubit 测定每个馏分的荧光值，确定需要收集的馏分。如果不不确定如何准备样品，请联系技术支持(techservice@echobiotech.com)。

⑤ 测定收集产物的颗粒浓度和蛋白浓度，根据实验的下一步应用目的，决定是否需要对收集到的外泌体产物进行进一步的浓缩富集。如需要进行浓缩，建议使用 100kD 超滤管，4000g 离心浓缩到目的体积即可。

5. Exosupur®柱的维护

① **再生**：当收集完目的外泌体馏分之后进行柱子的再生操作，用至少 10-20 ml PBS 缓冲液冲洗柱子，再生后的柱子加入 1ml PBS 备用或直接用于新的样本处理；若暂时不再使用，请用 5ml 封柱液*冲洗后，再加入 1ml 封柱液(浸没上筛板即可)，4°C 直立存放保存。

***封柱液配制**：含 20% 体积的乙醇的去离子水。(注意：新配置的封柱液务必要超声脱气后再使用，也可配置后静置过夜使用。)

② **清洗**：变性的蛋白或脂质复合物很难在再生步骤中被洗脱下来，积累过多会对分离过程的纯度及精度产生较大影响。可以通过下面的清洗消毒步骤来去除：总计加入 5ml 0.5M NaOH 清洗柱子，然后用 PBS 缓冲液冲洗柱子，直至流出液的 pH 变为中性。

【注意事项】

1. 对于新的柱子，可能上筛板和凝胶填料表面之间会有一定的空隙，是储存过程中凝胶沉降造成的，并不影响其性能，实验前将顶盖向下推动至填料表面即可。

2. 使用者需要自配无菌 PBS 过 0.2μm 滤膜或直接采购的已过膜的 PBS。为了尽可能的减少分离过程微生物核酸及蛋白污染物的引入，请使用无菌水配 PBS 溶液，配置后尽早使用 0.22μm 无菌滤器进行过滤除菌。新配置的 PBS 缓冲液超声脱气操作可以减少实验中在柱子中产生气凝胶，减少对分离参数的影响。

3. 当囊泡馏分用于后续高通量测序或者其他组学分析时，为避免交叉污染建议一根柱子只处理一个样本。

4. 多次重复使用后，因为重力等原因柱子松紧度及分离参数会发生变化，建议每根柱子的重复使用次数不多于 5 次。

5. 每次实验时，可以记录 1ml PBS 缓冲液通过排阻柱所需要的时间（先用 5ml PBS 清洗除去封柱液，再加 PBS 测试流速，正常约需 5-6min），流速显著减慢预示柱子被堵住或被污染，需要进行 10ml 0.5M NaOH 清洗消毒处理。

6. Exosupur®柱清洗消毒频率依据实验防污染级别，若排阻柱长时间不使用，建议排阻柱处理样本后即进行清洗消毒。清洗消毒可以最大程度减少排阻柱的微生物污染，避免微生物核酸及蛋白的引入。另外，当回收使用的柱子储存时间过长，柱子有颜色变化或者流速有显著变化时，建议进行柱子清洗消毒操作。

【结果展示】

1. 将 30-120nm 直径的 FITC 标记人造荧光囊泡添加到人血浆中，1ml 血浆样本进行排阻分离操作。通过 BCA 测定 Exosupur®排阻柱的各个馏分的蛋白浓度，通过 qubit 测定各个馏分的囊泡荧光强度，如图 1 所示。

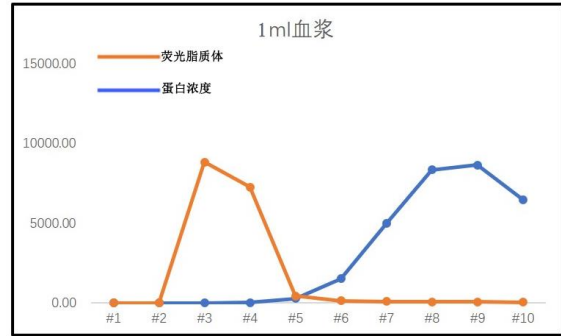


图 1. Exosupur®分离荧光脂体质和杂蛋白的效果

从图 1 中可以看出：

使用本型号 Exosupur®排阻柱处理 1ml 血浆样本时，囊泡的富集十分明显，且主要存在于 3、4 两个馏分中。而血浆蛋白主要存在于 6 号之后的馏分（由于胆红素等组分也具有一定的荧光背景，所以在蛋白富集的馏分也可以检测到较高的荧光信号值）。大于 6 的馏分通常含有高浓度的蛋白不建议用来做分析。

2. 使用 1ml 血浆进行分子排阻分离，提取每个馏分 RNA，通过 PCR 的方法检测 Exosupur®排阻柱的各个馏分中已报道的囊泡特异性 miR-146 的丰度，如图 2 所示。

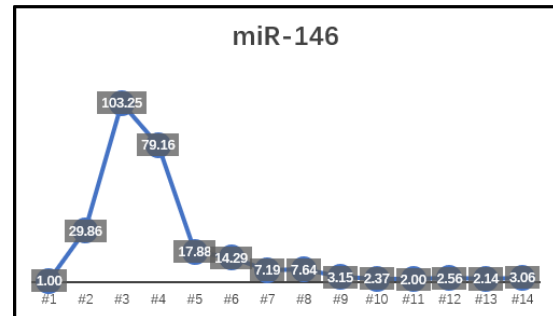


图 2. 囊泡富集的 RNA 在 Exosupur 各个馏分中的分布，各个馏分中 miRNA-146 的相对量以数字的形式展现在图中

从图中可以看出，囊泡富集的 miR-146 主要集中分布在 3 号及 4 号馏分。如果要得到更高的 RNA 回收率，可以收集 1-5 馏分。

【生产企业】北京恩泽康泰生物科技有限公司

单位名称：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

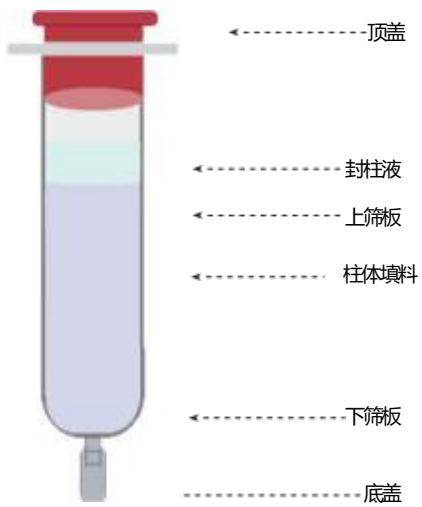
邮编：102609

电话/传真：010-69739599

邮箱：techservice@echobiotech.com

公司网址：<http://www.echobiotech.com/>

【排阻柱组成的示意图】



【使用前请微信扫码观看操作示范】

