

外泌体快速纯化试剂盒 (简易型)

SimpleExo Purify Kit

产品编号	试剂名称	规格	数量	保存条件
FRE-05	Buffer EXP	50 mL/瓶	1 瓶	4 °C
	Buffer EXN	20 ml/瓶	1 瓶	4 °C
	Buffer EXE	20 ml/瓶	1 瓶	4 °C
	Magnetic Beads (磁珠)	5 ml /瓶	1 瓶	4 °C
	针式过滤器 A (ϕ 25 mm, 5 μ m, 红色)	10 个/袋	1 袋	4 °C或 RT
	针式过滤器 C (ϕ 25 mm, 0.2 μ m)	10 个/袋	1 袋	4 °C或 RT
	说明书		1 份	

一、运输与存储条件。

本产品冰袋运输，4 °C保存，有效期 1 年。

二、注意事项（使用前阅读）。

1. 磁珠 4 °C存放，严禁冻存，否则失效。
2. 本产品提取的外泌体，不用于活性检测。
3. 实验过程中所用的 PBS 和 ddH₂O 必须使用滤膜孔径为 0.2 μ m 的滤器过滤。
4. 利用透射电镜检测外泌体形态时，请尽量使用新鲜提取的外泌体，或 4 °C存放的外泌体。外泌体冻存后易破裂，影响实验效果。
5. 为了您的健康，实验过程中请穿好实验服、佩戴乳胶手套和安全眼镜。

三、产品简介。

本产品是一款以特定修饰磁珠作为纯化介质，在配制的简单体系中快速提取外泌体的试剂盒，不需要特殊的实验装备，可以高效完成样品中的外泌体纯化，并用于后续的外泌体理化性质检测。本产品提取的样品包括细胞培养上清，细菌培养上清等蛋白含量较低的样品，不用于血清，或血浆等蛋白含量较高样品中的外泌体提取。

四、特点与优势。

1. 本产品操作简单，可以快速（2 h）提取样品中的外泌体。
2. 本产品提取的外泌体纯度高，杂蛋白含量低。
3. 本产品提取的外泌体浓度高，能够达到 10^{9-10} particles/ml。

五、实验所需试剂、耗材与仪器。

50 ml 离心管、50 ml 注射器、5 ml 注射器、磁力架（50 ml）、pH 计、旋转混匀仪、震荡混合仪（Vortex），冷冻离心机。

六、使用说明。

本产品提取外泌体的实验体系如下：

培养上清	24 ml
Buffer EXP	4.5 ml
Buffer EXN	1.5 ml
Magnetic Beads	0.5 ml
<hr/>	
合计	30.5 ml

本体系为最佳纯化系统，可以按照各成份比例扩大或缩小实验体系。

1. **样品制备（选做）。**吸取 30 ml 的细胞培养上清，利用试剂盒提供的针头过滤器 A（ $\phi 25$ mm，5 μ m，红色）过滤，去除杂质。本步骤的主要目的是去除样品中的细胞碎片等杂质。
2. 吸取 24 ml 去除杂质的细胞培养上清，转入 50 ml 离心管，并依次添加 4.5 ml Buffer EXP，1.5 ml Buffer EXN，及 0.5 ml 磁珠（磁珠使用前，先震荡混匀（Vortex），使磁珠分散，保证均匀移取）。盖紧离心管盖，颠倒混匀。
3. 将装有外泌体纯化系统的 50 ml 离心管转入旋转混合仪，4 °C 旋转混合 60 min（60-90 min）。

注意：旋转混合仪旋转速度不可太快，以保证磁珠与样品的充分孵育。

若需提高外泌体产量，旋转孵育时间增加到 90 min，但外泌体纯度会相应降低。

4. 将离心管插入磁力架，4 °C，静置 5 min，使磁珠聚集，并吸除上清液体。如果没有磁力架，可以用离心的方法来沉淀磁珠，具体流程是：将离心管转入冷冻离心机，4 °C，3 000 rpm（约 980 ×g），离心 3 min，沉淀磁珠，并吸除上清。
5. 将离心管转入冷冻离心机，4 °C，3 000 rpm（约 980 ×g），离心 1 min，转移离心管至磁力架中（防止磁珠分散），吸除残液。

注意：本步骤的主要目的是去除残液对外泌体的影响，提高外泌体纯度。

本步实验中离心力不可过大，以免磁珠过渡集结，不利于后期的外泌体洗脱。

6. 外泌体洗脱。在吸除残液的离心管中加入 0.5~1.0 ml Buffer EXE，利用移液器吹打混匀 10 次以上，或利用振荡器剧烈振荡（Vortex）10-30 sec，分散磁珠，洗脱磁珠表面吸附的外泌体。
7. 转入磁力架，4 °C，静置 2 min，聚集磁珠。**注：**如果没有磁力架，可以省略此步骤。
8. 转入离心机，10 000 rpm（约 11 000 ×g），4 °C离心 3 min，并转入磁力架上（防止磁珠散落），利用移液枪转移上清至新的 EP 管中，即为外泌体溶液。

注意：高速离心使磁珠高度聚集，并沉淀杂质，提高外泌体纯度。如果离心机转速无法达到 10 000 rpm，可以用最大转速（如 4 000 rpm）离心 5 min，达到沉淀磁珠的目的即可。

9. 去除杂质。利用膜孔径为 0.22 μm 的针头滤器（**针式过滤器 C**）过滤外泌体溶液，去除杂质和细菌，得到纯净的外泌体溶液。
10. 纯化的外泌体溶液可立即用于实验，或保存在-80 °C。

电镜检测流程（扣染法）：

1. 请使用新鲜提取的外泌体溶液，或 4 °C 保存的外泌体溶液（不超过 3 天），用于透射电镜检测。冻存或反复冻融会导致外泌体破裂，影响检测结果。
2. 利用移液枪吸取新鲜的外泌体溶液，滴一滴在 Parafilm 膜上。
3. 利用尖嘴镊子，取出电镜检测使用的铜网（碳膜支持铜网），将覆盖碳膜的一面（略显黑色的一面）对着外泌体溶液滴，放置在外泌体溶液滴上，呈漂浮状态。室温静置 3 min，使外泌体吸附到碳膜上。
4. 吸取磷钨酸溶液（2%，pH=7，由电镜室提供），滴到干净的 Parafilm 膜上。
5. 利用尖嘴镊子，夹取铜网，在滤纸上蘸几下，吸去多余的外泌体液体。并放置在磷钨酸液滴上，带有外泌体样品的一面朝向液滴，呈漂浮状态，室温，静置染色，2 min。
6. 用镊子夹取铜网，并用滤纸吸去铜网上多余的磷钨酸染液，置于干净的 parafilm 膜上，备用。
7. 将染好的铜网装入电镜检测装置，透射电镜检测，并拍照。

七、常见问题与分析。

问题	可能原因	解决方案
纯化的外泌体浓度低	样品用量较少。	增加纯化体系中的样品量，或扩大纯化体系。
	样品反复冻融，外泌体破坏。	使用新鲜的样品。
	试剂盒过期。	使用保质期内的试剂。
	磁珠冻存，吸附外泌体能力降低，甚至消失。	更换新的磁珠。
	未按规定体积添加磁珠，磁珠用量减少。	按照纯化体系要求，使用正确体积的磁珠。
	未按照纯化体系要求，随意更改纯化体系中各试剂比例。	按照纯化体系要求，按比例添加试剂盒中的各成分到纯化体系中。
	未按照说明书操作。	孵育方式与洗脱强度等实验操作请严格按照说明书进行。
	磁珠与样品孵育时间偏短。	延长孵育时间。
	洗脱强度偏低。	增加 Vortex 强度，延长 Vortex 时间。
	洗脱液体积偏大	减少洗脱液用量。
提取的外泌体蛋白浓度低	纯化的外泌体浓度较低。	参见上述解决方案。
	外泌体蛋白提取试剂的裂解能力较弱。	使用裂解能力强的蛋白提取试剂，如本公司生产的外泌体蛋白提取试剂盒（FRE-03）。
	本试剂盒纯化的外泌体纯度高，几乎不含杂蛋白。	增加外泌体浓度。
提取的外泌体蛋白中杂蛋白增多	样品与磁珠孵育时间过长，导致杂蛋白非特异性吸附。	减少样品与磁珠的孵育时间。
提取的外泌体 RNA 浓度低	外泌体浓度偏低	参见上述解决方案。
	外泌体用量偏少	增加外泌体用量。
	RNA 提取试剂盒不适合。	请选择本公司的外泌体 RNA 提取试剂盒（FRE-04）。