

外泌体快速纯化试剂盒 (磁珠型)

Exosome Rapid Purification Kit

产品编号	试剂名称	规格	数量	保存条件
FRE-01	Buffer EXD	100 mL/瓶	2 瓶	4 °C
	Buffer EXE	20 ml/瓶	1 瓶	4 °C
	Buffer EXV	12 ml/瓶	1 瓶	4 °C
	Magnetic Beads (磁珠)	5 ml /瓶	1 瓶	4 °C
	针式过滤器 A (φ25 mm, 5 μm, 红色)	10 个/袋	1 袋	4 °C或 RT
	针式过滤器 C (φ25 mm, 0.2 μm)	10 个/袋	1 袋	4 °C或 RT
	纯化柱型过滤器 (中柱)		10 套	4 °C或 RT
	说明书		1 份	

一、运输与存储条件。

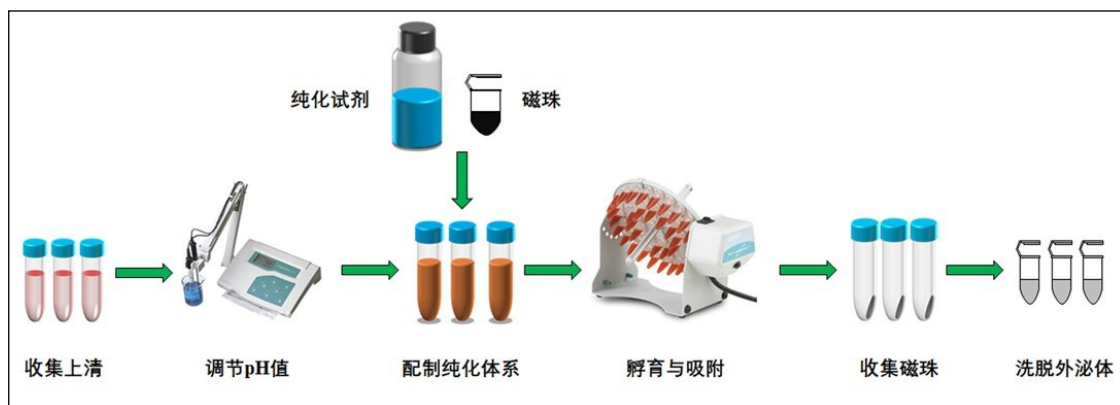
本产品冰袋运输，4 °C保存，有效期 1 年。

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. Buffer EXD 存放在 4 °C冰箱中，不可室温长时间放置。
3. 外泌体纯化体系的 pH 值请调节到 4.8-5.5，以 pH=5.1 时纯化效果最佳。
4. 若样品中外泌体浓度较低，可以浓缩后提取，以便得到高浓度的外泌体。
5. 实验过程中所用的 PBS 和 ddH₂O 必须使用滤膜孔径为 0.2 μm 的滤器过滤。
6. 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。
7. 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。

本产品主要用于提取细胞培养上清、细菌培养上清或其他液体样品中的外泌体，核心成份是自主研发的磁珠，表面修饰了特定的两亲性长链化合物，在 Buffer EXD 配制的外泌体纯化体系中，能够有效捕捉样品中的外泌体等细胞外囊泡。同时，利用磁力架或离心机沉淀磁珠，并吸除纯化体系后，可以用洗脱液 Buffer EXE 轻松的磁珠表面结合的外泌体洗脱下来，完成外泌体的高效纯化。



四、特点与优势。

1. 本产品提取的外泌体，完整性好、生物活性显著，可以用于后续的细胞或动物实验。
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^{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（样品）	20 ml
Buffer EXD	20 ml
Magnetic Beads	0.5 ml
合计	40.5 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. 调节样品 pH 值。吸取 20 ml 去除杂质的培养上清，转入 50 ml 离心管，利用 Buffer EXV 和 pH 计，调节培养上清的 pH 值到 4.8-5.5，以 pH=5.1 时提取效果最佳。

注意：纯化体系的 pH 值必须在 4.8-5.5（pH=5.1 时效果最佳），方可保证外泌体的纯化效果。

添加 0.5-0.7 ml 左右的 Buffer EXV 可以使大部分细胞培养上清的 pH 值降到 4.8-5.5 的范围内。

因此，首先添加 0.5 ml 的 Buffer EXV 到细胞培养上清中，混匀，检测 pH 值，然后根据情况，决定是否继续滴加 Buffer EXV。

3. 在调节好 pH 值的培养上清中，加入 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）。
4. 再加入 20 ml Buffer EXD，盖紧盖子，颠倒混匀。
5. 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 90 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。

若需提高外泌体纯度，旋转混合 60 min 即可，但外泌体产量会相应降低。

6. 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。
7. 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。

离心力不可过大，以免磁珠过度集结，不利于后期的外泌体洗脱。

8. 外泌体洗脱。在去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，洗脱磁珠表面结合的外泌体。
9. 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。
10. 转入离心机，10 000 rpm（约 11 000 ×g），4 °C 离心 3 min，并转入磁力架（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：高速离心可使磁珠高度聚集，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。

11. 去除杂质。在超净工作台内，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，且无菌的外泌体溶液。
12. 纯化的外泌体溶液可立即用于实验，或保存在 -80 °C。

13. 若样品较多，或外泌体溶液体积较小，可以使用纯化柱型过滤器来过滤洗脱的外泌体溶液，可以减少损失，提高效率，具体流程如下：
14. 因纯化柱型滤器用的是 15 ml 离心管，请将离心机转子更换成 15 ml 离心管适用的转子。
15. 将纯化柱型过滤器的滤芯装入 15 ml 离心管，组装成过滤器。吸取 1 ml 的 Buffer EXE，加入纯化柱型过滤器，转入离心机，8000 rpm（约 7 100 g），4 °C 离心 1 min。取出纯化柱型滤器，并取出滤芯，用移液器吸除离心管中的滤液，完成滤器清洗。
注：如果离心机的离心力达不到要求，可以降低转速，但需要增加离心时间，如 5 000 rpm，离心 3 min，也可达到类似效果。
16. 将滤芯重新装回 15 ml 离心管，并将洗脱的外泌体溶液加入滤芯，转入离心机，8000 rpm（约 7 100 g），4 °C 离心 1 min。
17. 取出纯化柱型滤器，离心管中的滤液即为过滤后的外泌体溶液，可立即用于后续实验，或保存于 -80 °C 冰箱。

七、纯化外泌体鉴定。

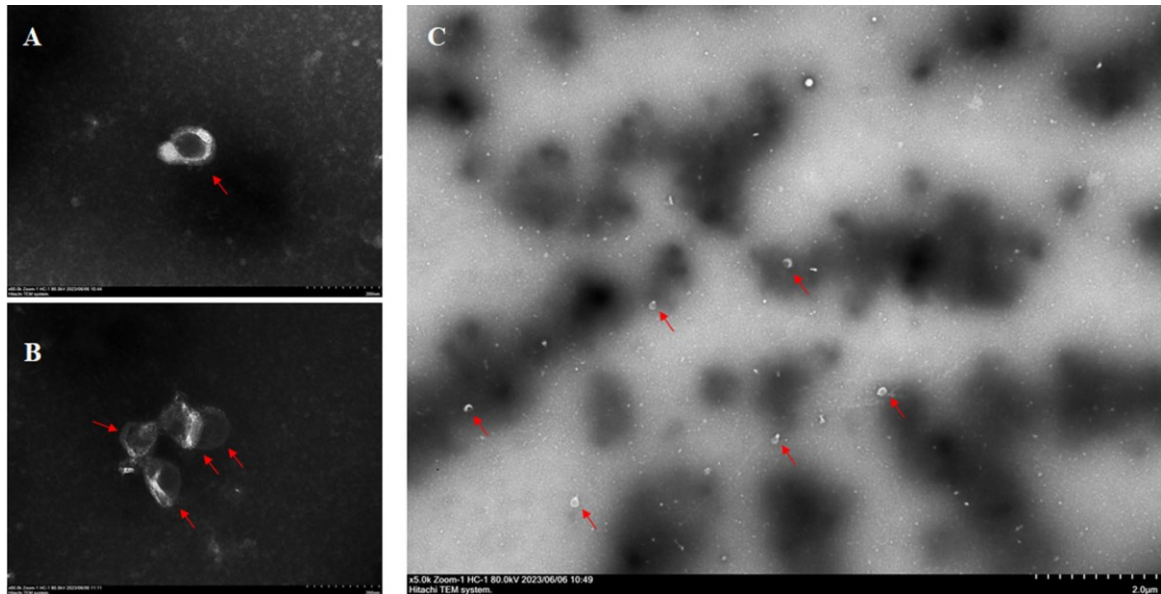


图 1. 透射电镜检测本产品提取的人脐带间充质干细胞外泌体

收集人间充质干细胞（MSC）培养上清，利用本公司的外泌体快速纯化试剂盒（FRE-01）提取外泌体，磷钨酸染色，透射电镜检测。结果显示：本产品提取的 MSC 外泌体，具有典型的杯托形态特征（图 1A 和 B），且同一视野内，可以检测到多个外泌体（图 1C），说明我们的试剂盒纯化的外泌体形态特征明显，数量多。同时，电镜背景清晰，说明外泌体的纯度很高。

电镜检测流程：

1. 请使用新鲜提取的外泌体溶液，或 4℃ 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. 利用尖嘴镊子，取出电镜检测使用的铜网（碳膜铜网），放置在 parafilm 膜上面，将覆盖碳膜的一面（略显黑色的一面）向上。
3. 利用移液枪吸取外泌体溶液，滴一滴在碳膜铜网上，室温静置 3-5 min，铜网碳膜吸附外泌体。
4. 使用滤纸，吸除多余的外泌体溶液，并利用尖嘴镊子，夹取铜网，放置在 Parafilm 膜上，覆盖碳膜的一面朝上，稍微晾干一下。
5. 吸取磷钨酸溶液（2%，pH=7，由电镜室提供），滴一滴到铜网的碳膜上，室温染色 3 min。
6. 用滤纸吸除多余的磷钨酸染液，并利用尖嘴镊子夹取铜网，放置在新的干净的 Parafilm 膜上，覆盖碳膜的一面朝上，晾干。
7. 将染好的铜网装入电镜检测装置，透射电镜检测，并拍照。

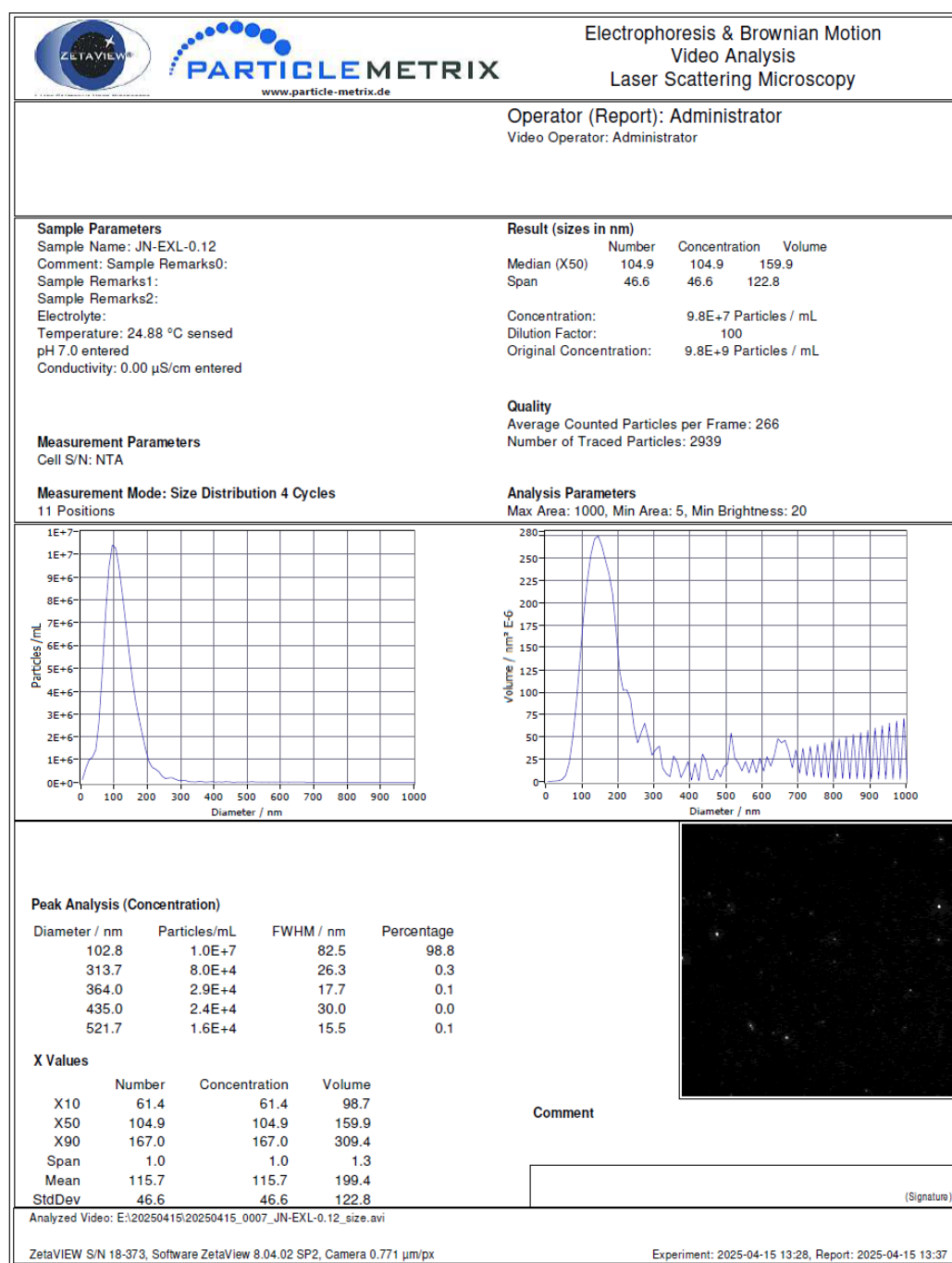


图 2. 人脐带间充质干细胞外泌体粒径与浓度检测（NTA）

收集人脐带间充质干细胞培养上清，利用本公司的外泌体快速纯化试剂盒（FRE-01）提取样品中的外泌体，并利用 Zetaview 的仪器检测外泌体的粒径等各项参数。结果表明，提取的外泌体粒径峰值为 104.9 nm，符合外泌体的大小要求，同时外泌体的原始浓度 9.8×10^9 particles/ml。

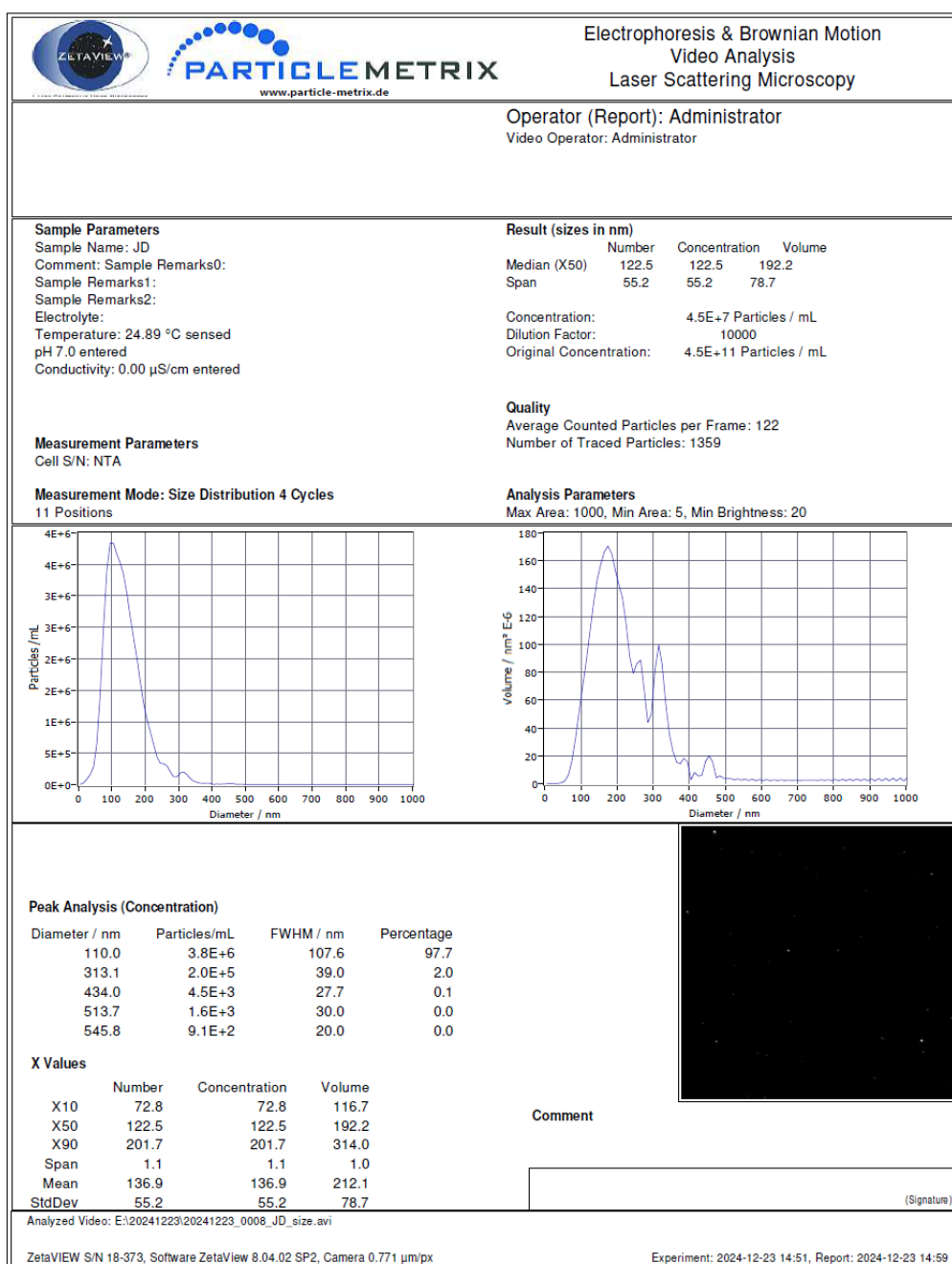


图 3. 人自然杀伤细胞（NK 细胞）外泌体粒径与浓度检测（NTA）

收集人自然杀伤细胞（NK 细胞）培养上清，利用本公司的外泌体快速纯化试剂盒（FRE-01）提取样品中的外泌体，并利用 Zetaview 的仪器检测外泌体的粒径等各项参数。结果表明，提取的外泌体粒径峰值为 122.5 nm，符合外泌体的大小要求，同时外泌体的原始浓度 4.5×10^{11} particles/ml。

七、常见问题与分析。

问题	可能原因	解决方案
提取的外泌体浓度低	样品用量较少。	增加纯化体系中的样品量。
	样品中外泌体含量较低。	浓缩样品。
	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。
	细胞培养上清的 pH 值没有调节到 pH=4.8-5.5	请利用 pH 计和 Buffer EXV 调节细胞上清的 pH 值到 4.8-5.5，且以 pH=5.1 最佳。
	磁珠冻存，捕捉外泌体能力降低，甚至消失。	更换新的磁珠。
	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）。