



# 外泌体快速纯化试剂盒

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 使用方法.....	2
3. 注意事项.....	2
4. 参考信息.....	2
5. 常见问题与解答.....	4
6. 试剂盒组成.....	4
7. 订购信息.....	4
8. 相关产品.....	4

## 1. 产品介绍

### 1.1 产品描述

本试剂盒通过束缚水分子使溶解度较低的外泌体和其他细胞外囊泡 (EVs) 等细胞膜囊泡析出, 随后可通过短时间的低速离心来收集这些难溶组分。另外本试剂盒通过一系列的配方优化, 提高了外泌体的回收率, 适用于下游的细胞共培养、电镜分析、Western Blot、荧光定量 (qPCR) 和高通量测序等应用。

### 1.2 外泌体功能介绍

外泌体和其他细胞外囊泡 (EVs) 属于细胞膜囊泡, 包含蛋白, mRNA, microRNA, DNA 和脂类。外泌体直径 30-150nm, 多种细胞在正常及病理状态下均可分泌外泌体, 其主要来源于细胞内溶酶体微粒内陷形成的多囊泡体, 经多囊泡体外膜与细胞膜融合后释放到胞外基质中, 且外泌体天然存在于体液中, 包括血液、唾液、尿液、脑脊液和乳汁中。外泌体具有多种多样的功能, 其功能取决于其所来源的细胞类型, 其可参与到机体免疫应答、抗原提呈、细胞迁移、细胞分化、肿瘤侵袭等。

### 1.3 外泌体的形成过程

膜双层通过磷脂的不对称分布来维持脂质的“多面性”。外膜富含磷脂酰胆碱和鞘磷脂, 而内膜主要由磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 和磷脂酰乙醇胺形成。微泡由质膜出芽形成, 主要原因是由于  $Ca^{2+}$  通过磷脂双分子层破坏了膜的不对称性, 导致磷脂跨膜双层的重新分配, 促进膜起泡, 最终导致出芽过程的进行, 出芽形成芽泡, 将泡体中的外泌体释放到细胞外, 这样就形成了一个完整的外泌体。

### 1.4 试剂盒组份

该试剂盒主要包括两种试剂, 具体见下表:

表1: 试剂盒组分

名称	备注
QE-Buffer A	促进外泌体聚集沉淀
QE-Buffer B	中性缓冲液, 适用于外泌体浓缩重悬

### 1.5 样本选择

外泌体快速纯化试剂盒适用于多种样本的外泌体提取与纯化, 我们测试过培养基上清、血清、血浆以及尿液样本, 都能够满足下游检测和鉴定需求, 但植物外泌体没有进行测试, 客户如有需求可自行检测。

### 1.6 保存与运输

运输: 冰袋运输, 不可冻结。

保存: 2-8 °C 冷藏保存, 不可冻结。



## 2. 使用方法

### 2.1 样品预处理

取待纯化的样品进行差速离心, 首先用 300g 离心 10min, 继续收集上清, 再用 2000g 离心 10min, 最后用 10000g 再离心 10min, 将收集的上清用 0.22 $\mu$ m 的滤膜进行过滤处理(可选)。

### 2.2 样品中外泌体提取

将上一步收集的滤液样本与 QE-Buffer A 按 2: 1 混合(50ml 的样本加入 25ml 的 QE-Buffer A), 充分混匀后 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, 注意混匀后最好是静置孵育过夜, 不要在混合器上旋转。

### 2.3 外泌体浓缩富集

将孵育后的混合液在 4 $^{\circ}$ C 下 12000 rpm 离心 1h, 用一定体积的 QE-Buffer B 重悬沉淀(50ml 的样本加 1ml QE-Buffer B 重悬), 也可根据沉淀的量调整 QE-Buffer B 的重悬体积, 用移液器轻轻吹打混匀后, 在室温放置 30min 可充分溶解。

### 2.4 外泌体保存与应用

将收集的外泌体溶液保存于 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中, 尽量避免反复冻融, 可分装以备下游检测和应用。如需无菌培养, 可使用 0.22  $\mu$ m 无菌过滤器进行过滤收集。

## 3. 注意事项

- 1) 本试剂盒无菌无热源, 请在洁净环境下使用;
- 2) 所有试剂在低温中取用, 所有操作尽量在低温环境下进行, 这样可以更好的保持外泌体的完整性;
- 3) 外泌体较脆弱, 建议尽量在低温下进行操作, 防止外泌体活性受损, 影响下游实验;
- 4) 提取的外泌体保存在 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 中, 可保存半年时间, 外泌体分装使用, 尽量避免反复冻融。

## 4. 参考信息

### 293 细胞外泌体纯化:

- 1) 取 50ml 培养基上清, 差速离心去除颗粒沉淀, 加入 25 ml 的 QE-Buffer A 溶液;
- 2) 混匀后, 静置于 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育;
- 3) 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm 离心 1 h 回收沉淀, 并使用 1ml QE-Buffer B 溶液重悬沉淀;
- 4) 对洗脱产物进行标志物蛋白的 WB 检测、纳米流式检测以及电镜检测, 结果请见图 1—3。

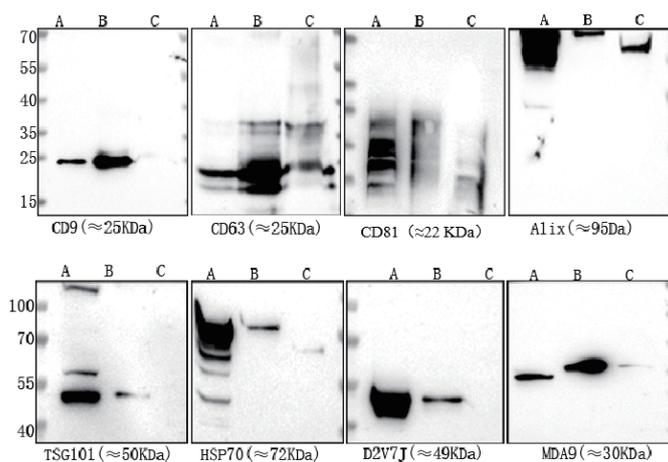


图1.外泌体快速纯化试剂盒提取外泌体的WB电泳图

将洗脱的外泌体进行 WB 检测, WB 抗体购自 CST 的 Human Reactive Exosome Marker Antibody Sampler Kit (80610)。图 1 中 A 为外泌体快速纯化试剂盒纯化的外泌体, B 为 Magneti-G 外泌体亲和纯化试剂盒(BK0046)纯化的外泌体, C 为对照厂家商品化产品纯化的外泌体。从图 1 中可以看到, 使用 Magneti-G 外泌体亲和纯化试剂盒(BK0046)和外泌体快速纯化试剂盒提取的外泌体几个主要标志物都有较高的阳性, 较商品化试剂而言, 得率更高。

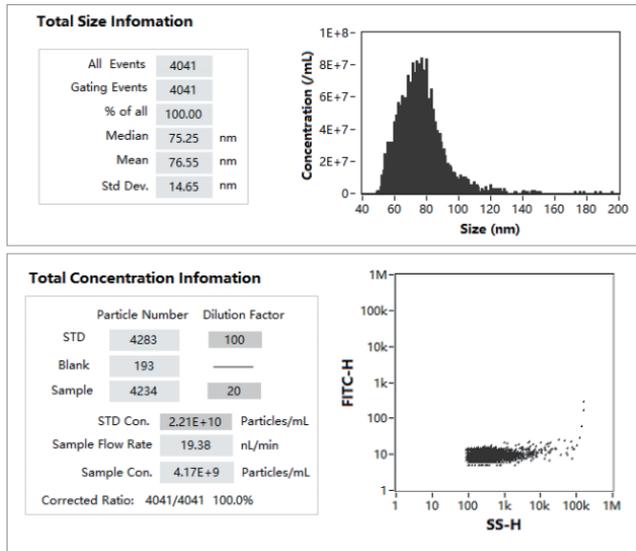


图2.外泌体快速纯化试剂盒分离外泌体的纳米流式检测

将浓缩的外泌体进行纳米流式检测，从图 2 中可以看出，50ml 样本可以纯化出  $4.17 \times 10^9$  particles/ml 的 EVs，从粒径分布来看主要集中在 75 nm 左右，符合外泌体的特征。

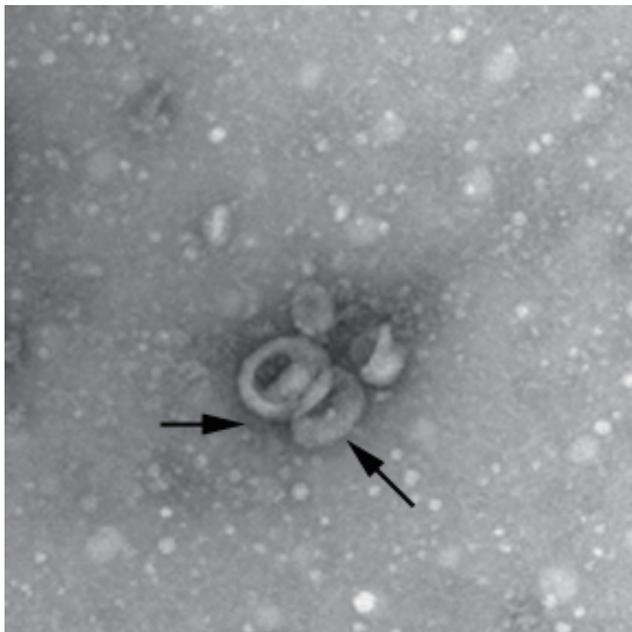


图3.外泌体快速纯化试剂盒分离外泌体的的电镜检测

将洗脱的外泌体进行电镜负染色，从图 3 中可以看出，电镜下负染 exosome 显示为 80 nm 左右的茶杯状膜泡，形态完整，较小的脂质颗粒在电镜下也常会被观察。



## 5. 常见问题与解答

### 5.1 如何快速鉴定纯化后的产物是否含有外泌体?

- 1) 直接裂解洗脱样本,通过吸光值、BCA 或者 Bradford 检测下蛋白浓度,通常外泌体的获取量和蛋白浓度呈现正相关;
- 2) 外泌体检测最直接的方式是仍然是 WB 检测,外泌体的几个特征性标志物 CD9、CD63、CD81、TSG101 和 HSP70 等,通常 WB 选用 2-3 个特异性蛋白进行 WB 检测可初步判断样品中是否含有外泌体。

### 5.2 为何洗脱后的样本中不含有外泌体或含量低于正常值?

- 1) 可能是样本中所产生的外泌体较少,适当扩大预处理的样本容量,并排除培养过程中因活率过低或其它原因导致的外泌体污染;
- 2) 虽然看不见但可以结合下游实际需求进一步分析,可组合其它的检测方法如 WB、纳米流式等进行辅助验证;
- 3) 在实际提取分离过程中是否严格按照说明书要求进行分离纯化,排除是否因操作不当造成样本的流失;
- 4) 根据所提取样本的特性而定,提取本试剂盒推荐来源以外的外泌体时,并不能够保证提取效率与从 293 细胞培养基上清中提取效率相当,但仍需尽可能保证 4°C 的条件下进行,排除外泌体降解的可能以及样本来源差异。

### 5.3 如何长时间保存外泌体洗脱液?

- 1) 外泌体会降解不推荐长时间保存,如果不得以需要长期储存,建议在 -20°C 或 -80°C 下保存最长不超过 30 天,若在 4°C 下储存最长不超过 7 天;
- 2) 注意分装,避免反复冻融。

### 5.4 外泌体分离方法哪种方式最好?

- 1) 没有最好的方法,主要根据实验需求而定,本款试剂盒的最大特点就是比传统的超速离心法更快,且对设备的依赖性更低;
- 2) 有条件的情况下可以尝试多种方式组合提取。

## 6. 试剂盒组成

试剂盒成分	规格 /50ml	规格 /250ml
QE-Buffer A	50ml	250ml
QE-Buffer B	5ml	25ml
说明书	1 份	

## 7. 订购信息

名称	货号	规格
外泌体快速纯化试剂盒	BK0047-01	50ml
	BK0047-02	250ml

## 8. 相关产品

名称	货号
Magneti-G 外泌体亲和纯化试剂盒	BK0046
Anti-CD19 mAb	BP0066