

外泌体纯化试剂盒-10 mL

货号: RK05870

规格: 1 Box

◆ 产品简介

本试剂盒是专门用于从血浆、血清、尿液、细胞上清和脑脊液中提取细胞外囊泡的小量纯化试剂盒。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。

◆ 试剂盒包装清单

组分名称	规格
纯化柱*	4 根
适配器	4 套
说明书	1 份

*每根柱子填料 10 mL, 一次最多可处理 1 mL 样本(处理>1 mL 的样品,推荐使用本公司另一型号柱子,货号:RK05871)

◆ 自备试剂

- 无菌 PBS 溶液(须用 0.22 μm 滤膜过滤)
- 无水乙醇
- 超滤管(截留分子量 100KD)
- 收集管(1.5 mL EP 管或者 15 mL 离心管)

◆ 保存和运输

常温运输,收到试剂盒后请于 4℃ 直立存放,有效期 12 个月。

◆ 操作方法

1. 样品预处理

样品预处理可与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。

①细胞上清:收集细胞上清,300g 离心 10min 去除死细胞,3000g 离心 10min 去除细胞碎片,0.22 μm 微孔滤膜过滤,过滤后用截留分子量 100kD 的超滤管进行浓缩,浓缩体积比约为 1:10~20,浓缩后的细胞上清备用。

②尿液:尿液先 3000g 离心 10min 去除沉渣,上清进行 0.22 μm 微孔滤膜过滤,过滤后用截留分子量 100kD 的超滤管进行浓缩,浓缩体积比约为 1:20,浓缩后的尿液备用。

③血浆/血清:获得血清/血浆后,1500g (4℃),离心 20min 取上清,3000g (4℃),

离心 15min 取上清，再过 0.8 μm 滤膜过滤，过滤后上 SEC 柱进行分离。

血浆/血清样本成分复杂，若想获得满足组学研究需求的外泌体样本建议使用超速离心、超滤等方法与本试剂盒联合使用提高外泌体纯度。

其他样本类型如果不清楚如何进行前处理，可以联系 ABclonal 技术支持。

2. 柱平衡

①将纯化柱从 4°C 冰箱取出，垂直固定（固定装置货号：AI10051）。

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，可能引入气凝胶，影响分离效果。

③将废液收集管（普通离心管或者烧杯都可以）放置于排阻柱下方，取下柱子顶盖，弃去柱子上的封闭液（**直接倒掉或者用移液器吸去**），加入室温放置的 PBS*约 1mL，插入带有针筒型空柱的适配器（**适配器底部末端需浸入 PBS 中**），向针筒型空柱中加 20 mL 即两倍柱体积 PBS*，取下柱子底部的底盖。待空柱中的 PBS 流完后（流速约 0.25 mL/min）取下适配器和空柱，盖上底盖，备用。

***注意事项: 尽量使用当天新配的经过 0.22 μm 滤膜过滤的 PBS, 或采购的已过膜的 PBS, 避免引入微生物及颗粒物污染。如果使用 4° C 冰箱保存的 PBS 溶液, 必须平衡到室温后再用, 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 1mL 的样品（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 PBS（建议每次添加 500 μL 洗脱液，待上一个 500 μL 洗脱液全部进入排阻柱内后，再添加下一个 500 μL 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 500 μL 流出液记为 1 个馏分，该型号柱子，前 3 个馏分为不含外泌体组分的空隙体积，不用收集。（注意：也可以直接加入 1.5mL 的 PBS 溶液洗脱不收集。）

4. 外泌体收集

①高回收率收集方案：立即收集空隙体积之后的 5 个外泌体馏分（即馏分 4, 5, 6, 7, 8），每个馏分 500 μL 。（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高纯度外泌体收集方案：只收集外泌体浓度最高的 5, 6, 7 馏分，每个馏分 500 μL 。（注意：如不区分馏分可直接加入 1.5mL PBS 洗脱到一个收集管里，以减少加样和收样操作步骤）。

③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 500 μ L 流出液作为一个馏分，收集 20 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。如果不确定如何准备样品，请联系技术支持。

④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. 纯化柱的维护

①收集完目的外泌体馏分之后，用至少 20 mL PBS 冲洗柱子进行再生操作。再生后的柱子可用于新的样本处理；或用 10mL 封闭液冲洗后，再加入 1-2mL 封闭液（浸没上筛板即可），4 $^{\circ}$ C 直立存放保存。

*封闭液配制：含 20% 体积的乙醇的去离子水。（**注意：新配置的封闭液务必要超声脱气后再使用**）

②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 10mL 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，上筛板和凝胶填料表面之间可能会有一定的空隙，这是储存过程中凝胶沉降造成的，并不影响其性能，实验前将筛板向下推动至填料表面即可。

2. 使用者需要自备无菌 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 0.22 μ m 无菌滤器进行过滤除菌，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 10mL PBS 清洗除去封柱液，再加 PBS 测试流速，正常小于 4 分钟），流速显著减慢预示柱子被堵住或被污染，需要进行清洗消毒处理。

6. 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，当回收使用的柱子储存时间过久，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】

将 30-120nm 直径的 FITC 标记人造荧光囊泡添加到人血浆中，1 mL 血浆样本进行排阻分离操作。通过 BCA 测定纯化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。

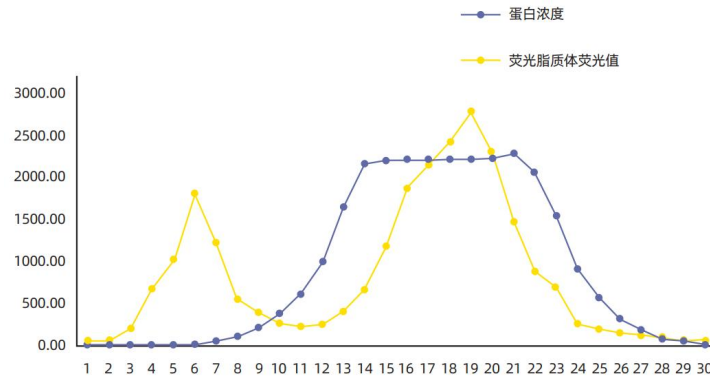


图 1：纯化柱分离荧光脂质体和杂蛋白的效果

从图 1 中可以看出：

1. 使用 10 mL 的纯化排阻柱处理 1 mL 血浆样本时，囊泡的富集是十分明显，且主要存在于 5、6、7 三个馏分中。而血浆蛋白主要存在于 10 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 10 的馏分通常含有高浓度的蛋白不建议用来做分析。

2. 如果为了得到尽可能纯的高浓度囊泡，建议只收集 5, 6, 7 三个馏分；如果为了得到尽可能高的囊泡回收率，可以一次性收集 4-8 号馏分。