



# 外泌体快速纯化试剂盒(柱式法)

## 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. 订购信息及相关产品.....	5

## 1. 产品介绍

### 1.1 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。

### 1.2 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。

### 1.3 试剂盒介绍

试剂盒采用分子排阻色谱原理, 根据被分离样本中组分的分子尺寸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, 可以温和有效的获得完整的外泌体, 可用于蛋白提取分析、RNA 提取分析、细胞功能检测等下游生物学实验。

### 1.4 层析柱性质

纯化柱装有 8.5ml Smartarose CL-4B, Smartarose 是一种球形琼脂糖凝胶过滤基质, Smartarose CL-4B 琼脂糖含量 4% 的 Smartarose 4B 的衍生物, 化学和物理性能更优异, 流速更快。性能见表 1。

表1: 产品性能

项目	性能
填料	Smartarose CL-4B
基质	4%琼脂糖
分离范围	$70 \times 10^3$ - $20 \times 10^6$
PH 稳定性 **	3-13
保护液	20% 乙醇
保存条件	2-8°C保存

### 1.5 样本选择

柱式法外泌体纯化原理是尺寸排阻, 根据分子量大小实现先后分离, 过柱后样品会被稀释, 我们建议客户使用外泌体浓度较高的样品进行过柱, 保证收率。



## 1.6 保存与运输

运输：常温运输。

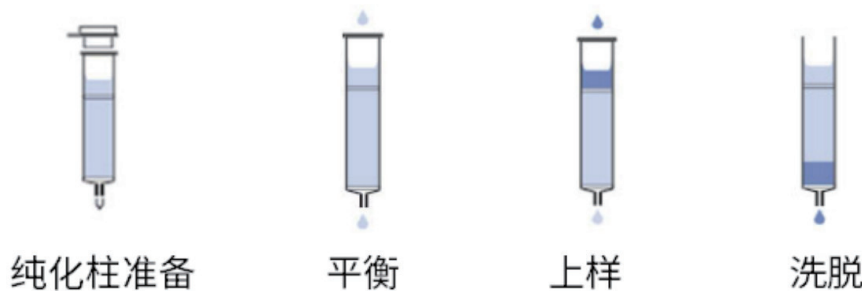
保存：2-8 °C冷藏保存。

## 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)，如果样本体积较大可以配套使用本公司外泌体快速纯化试剂盒(BK0047)进行浓缩，浓缩方法参考外泌体快速纯化试剂盒说明书或自购超滤管(100 kD)进行浓缩。

### 2.2 样品纯化



#### 2.2.1 脱盐柱准备

将纯化柱垂直置于重力柱支架上，或用铁架台固定，先后打开上盖、下盖，依靠重力流干保护液。

#### 2.2.2 平衡

加入 4 ml 平衡液(自主选择合适溶液)对预装介质进行平衡，重复 5 次，最终使用平衡液体积约 3 倍介质体积。

#### 2.2.3 上样

加入样品，样品上样体积 0.5ml，上样体积不足时用平衡液补充样品至 0.5 ml。

#### 2.2.4 洗脱

待样品进入填料后，继续加入平衡液进行洗脱，分管收集洗脱液。从加入样品开始计算，先收集前端 4 管，0.5ml 每管，此部分为平衡液，然后再按照固定体积 0.5~1.0 ml/ 管收集样品，检测每管外泌体含量，计算回收率。平衡液至少添加至杂质蛋白洗脱完全再停止(推荐洗脱 17ml，约两倍柱体积)。

### 2.3 外泌体保存和应用

将收集的外泌体溶液保存于 -20°C 或 -80°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) 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；
- 2) 提取的外泌体保存在 -20°C 或 -80°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 培养基上清进行预处理，差速离心去除杂质颗粒，使用外泌体快速纯化试剂盒(BK0047)进行浓缩 50 倍(重悬至 1ml)；
- 2) 纯化柱置于重力柱支架上，先打开上盖，再拔掉下堵头，自然重力流干保护液；
- 3) 用 20ml 1 $\times$ PBS 缓冲液平衡纯化柱，重力流干；
- 4) 上样 1.0ml 浓缩样品，上样即开始收集，标记第 1 管；



- 5) 使用 1×PBS 缓冲液洗脱纯化柱,0.5ml/ 管收集 35 管。
- 6) 对收集样品进行分光光度计检测, WB 检测, 纳米流式检测及电镜检测。

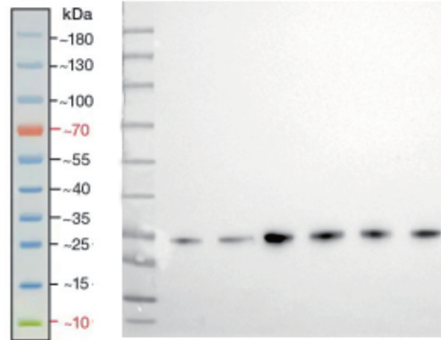


图1.外泌体快速纯化试剂盒(柱式法)提取外泌体的WB图  
(从左到右分别为标准蛋白、对照、第6~10管洗脱样)

对洗脱的外泌体样本(第 6~10 管)进行 WB 检测, WB 检测抗体为 CD9(内供抗体), 检测结果见图 1。从 WB 图中可以看出, 相比对照组(BK0047 捕获的外泌体样本)而言, 第 7 管具有最高的响应值(显色最深), 并且随后洗脱而出的 4 管均有外泌体标志物信号检出。

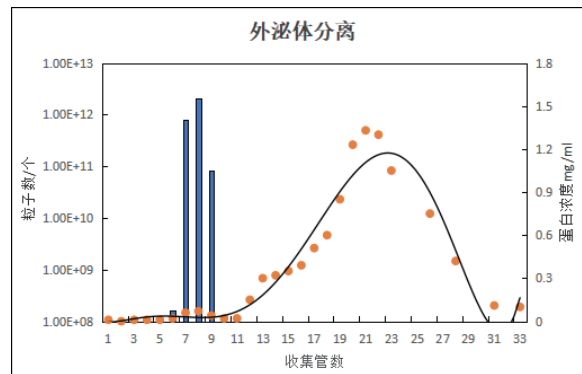


图2.外泌体快速纯化试剂盒(柱式法)提取外泌体的蛋白浓度与外泌体浓度检测

将洗脱样本, 分管检测吸光值以确定蛋白浓度, 并通过纳米流式进行外泌体浓度检测, 其中第 7、8 管富含较多的外泌体样粒子, 且杂蛋白浓度相对较低, 纯度可达  $1 \times 10^{12}$  particles/mg。

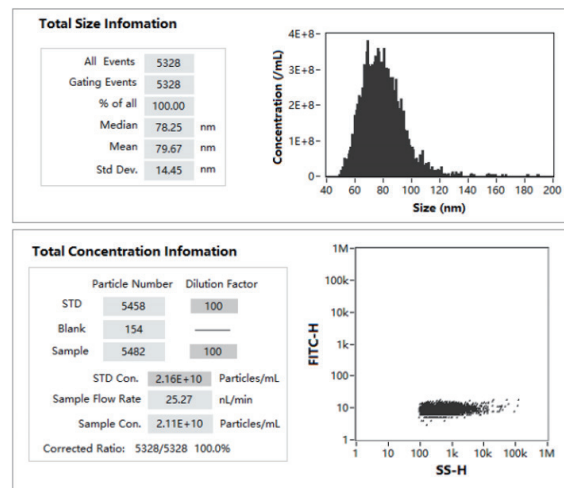


图3.外泌体快速纯化试剂盒(柱式法)提取外泌体的的纳米流式检测



将洗脱的外泌体样本分别进行纳米流式检测(第 6~9 管, 仅展示部分实验数据), 回收的外泌体浓度可达  $2.11 \times 10^{10}$  particles/ml (稀释 100 倍), 粒径主要集中在 78 nm 左右, 符合外泌体特征。



图4.外泌体快速纯化试剂盒(柱式法)提取外泌体的电镜检测

将洗脱的外泌体稀释后进行电镜负染色, 电镜下洗脱样本中的粒子具有典型的茶杯状形态, 粒子形态完整, 符合外泌体的典型特征。

## 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 /1ml*1PK	规格 /1ml*5PKs
纯化柱	1 支	5 支
说明书	1 份	



## 7. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
外泌体快速纯化试剂盒(柱式法)	BK0056-01	1ml*1PK
	BK0056-02	1ml*5PKs
Magnet-G 外泌体亲和纯化试剂盒	BK0046-01	5T
	BK0046-02	50T
外泌体快速纯化试剂盒	BK0047-01	50ml
	BK0047-02	250ml
Anti-CD19 mAb	BP0066	