

外泌体提取试剂盒

（动物组织）

Cat NO: IME-I004

产品描述

外泌体是细胞分泌的含有 RNA 和蛋白质的囊泡（30-200 nm），在体液中大量存在，包括血液、唾液、尿液和母乳等。外泌体在细胞间充当信使，运送货物特异性使其具有不同的功能。然而，外泌体的形成、货物的分选方式以及它们参与的生物途径仍未完全研究清楚。外泌体研究需要分离得到完整的外泌体，当前超速离心是分离的金标准，但这需要昂贵的设备。

本试剂盒提供了一种分离纯化动物组织中的外泌体的简单可靠的方法，通过促进不易溶解的组分（即外泌体）从溶液中沉淀，操作简单，结果重复性好，杂蛋白含量少，只需普通离心机就可以分离得到较纯的完整外泌体，可用于电镜粒径分析，RNA 和蛋白分析，以及细胞和动物实验等。

适用范围

本说明书适用于从动物组织中纯化外泌体，请严格参照说明书操作。本产品仅用于生命科学研究，不得用于医学诊断及其他用途！

运输和存储条件

- （1）运输条件：Solution A2 冰袋运输，其他组分常温运输，国内现货 2~3 天即可送达。
- （2）储存条件：Solution A2 存储于-20℃，其他组分常温储存。

产品组成信息

表 1. 试剂盒组成信息

产品货号	产品名称	产品规格	储存
IME-I004M	Solution A2	48 mL	-20℃，2 年
	Exosome Concentration Solution	12 mL	常温，2 年
	Exosome Purification Filter	20 Tubes	

自备材料

冷冻高速离心机，2 mL 离心管，1 ×PBS 缓冲液（无菌）。

操作流程

样品预处理：

1、提前将 Solution A2 置于 4℃或冰上融化并混匀。

2、在消毒器皿（置于冰上）中将组织剪切成 1 mm³~3 mm³ 左右的碎组织块（剪切得越小越好），将组织碎块转移至离心管中，加入不少于 10 倍体积的 1 ×PBS 缓冲液，振荡混匀后 300g 离心 10 min，弃上清。

3、按照每 0.1 g 组织块加入 1 mL Solution A2，将组织块与 Solution A2 混匀在 2 mL 离心管中，横放于 37℃、80 rpm 恒温摇床上孵育 20 min（或在 37℃水浴锅中孵育 30 min，每 5 min 混匀一次）。

4、将上述反应液于 4℃以 3000g 离心 10 min，将上清液转移至新的离心管中，然后 4℃以 10000g 离心 30 min，去除样品中的杂质碎片，将上清液转移到新离心管中。

5、（可选）如果有 0.22μm 过滤装置，可进行过滤以进一步去除大囊泡。

外泌体提取：

1、在处理后的离心上清液中按 4：1 加入 Exosome Concentration Solution（ECS），如 2 mL 上清液加入 0.5 mL 的 ECS。（注：使用前上下颠倒 5-6 次混匀）

2、通过涡旋震荡器混匀 1min 或上下倒置 10-12 次，直到溶液均匀。

3、将样品在 4℃孵育 1h 以上（增加静置时间可提高外泌体得率，但不可超过 24 h）。

4、孵育后，将样品以 10000g 离心室温下 60min，移液吸出上清液并丢弃，倒置离心管晾干2min。（注：如果使用的是定角转子，沉淀分布在离心管外侧整个侧面）。

5、将试管以 10000g 离心2min，弃去上清，至无任何残留液体。

6、取适量 $1 \times \text{PBS}$ 重悬外泌体（建议每 0.1 g 组织用 200 μL 左右 $1 \times \text{PBS}$ 重悬）。

7、将收获的外泌体颗粒粗品转入 Exosome Purification Filter (EPF 柱) 上室中，于 4°C 以 3000 g 离心 10 min，离心后收集 EPF 柱管底的液体，此液体即为纯化后的外泌体颗粒（注：EPF 柱不可重复使用）。

8、纯化后的外泌体以合适体积进行分装冻存于 -80°C 低温冰箱中，以备后续实验使用。

注意事项

（1）使用前请仔细阅读说明书，建议严格参照本说明书进行纯化外泌体操作。若需技术支持，欢迎随时致电。

（2）操作过程中需使用无菌器材和试剂，避免外泌体样本被污染。

（3）孵育和离心步骤需在 4°C 下进行，以保持外泌体的稳定性。

（4）提取的外泌体可重悬于 PBS 中，分装后于 -80°C 保存，避免反复冻融。

常见问题

（1）提取的外泌体如何保存？

短时间内使用，可在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 短暂保存 1~2 天，若长时间保存，建议放在 -80°C 冰箱中，避免反复冻融。此外，可使用商业化的外泌体储存试剂，进一步保护外泌体。

（2）重悬的外泌体颗粒不能通过或部分通过纯化柱，如何处理？

当提取的外泌体含有较多的污染蛋白质，离心经过纯化柱时可能会堵塞滤膜，因此，重悬时需要多次吹打，彻底溶解沉淀，然后在经过纯化柱纯化。

（3）提取外泌体产量低。

某些组织（如脑、脂肪）中外泌体分泌量低，需大量起始样本，导致操作难度增加。

（4）如何鉴定提取的外泌体？

一般确定外泌体一般需要三个条件：电镜形态观察，颗粒粒径测定和蛋白标志物检测（Western Blot 检测 CD9、CD63 以及 CD81 任意两个表达阳性；Alix、Tsg101 任意一个表达阳性；Calnexin、histone 3 以及 GM130 任意一个表达阴性）。