

外泌体提取试剂盒

（培养细胞上清、尿液或其他体液）

Cat NO: IME-I001

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培养细胞上清、尿液或其他体液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

本说明书适用于从细胞上清、尿液或其他体液中纯化外泌体，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：常温运输，国内现货 2~3 天即可送达。
- （2）储存条件：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-I001S	Exosome Concentration Solution	12 mL	常温，2 年

	Exosome Purification Filter	2 Tubes	
IME-I001M	Exosome Purification Filter	120 mL	
	Exosome Concentration Solution	20 Tubes	

自备材料

冷冻高速离心机，50 mL 离心管，1.5 mL 离心管，1×PBS 缓冲液（无菌）。

操作流程

样品预处理：

1、如果是冻存于-80℃样品，取出于 4℃或冰上溶化，如果是新鲜样品，收集后置于冰上，建议单次提取时的样品量不低于 20 mL。

2、在 4℃ 3000g 离心 30min 去除细胞碎片或死细胞，若沉淀较多，重复该步骤一次。

3、将离心上清液转移至新的离心管中，于 4℃以 10000g 离心 30 min，以去除样品中的大囊泡，处理后的上清液转移到新离心管中。

4、（可选）如果有 0.22μm 过滤装置，可进行过滤处理以进一步去除如凋亡小体等大囊泡。

外泌体提取：

1、加 Exosome Concentration Solution（ECS）：在处理后的离心上清液中按 4：1 加入 ECS，如 20mL 上清液加入 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 8h 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，将样品在 4℃以 10000g 离心 60min，移液吸出上清液并丢弃，尽量去除液体。（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、将试管在 4℃以 10000g 离心2min，弃去上清，至无任何残留液体。

6、取适量 1×PBS 重悬外泌体（建议每 20 mL 上清用 100~200 μL 左右 1×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℃ 以 3000 g 离心 10 min (可适当延长离心时间), 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℃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℃ 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℃保存, 避免反复冻融。

常见问题

(1) 细胞培养时, 如何去除培养基中牛血清来源的外泌体?

多数情况下, 体外细胞培养时培养基中需要添加牛来源血清, 但血清中含有大量外泌体, 会污染细胞分泌的外泌体, 影响外泌体后续实验, 可以采取以下三种方法操作: 当细胞长到近乎单层, 换成无血清培养基, 在 24~48 h 后收集细胞培养上清; 将血清以 100000g 超速离心 10h 以上去除血清外泌体, 或者购买商业化的去除外泌体的血清; 还可查询有无化学成分确定的, 无血清培养基进行替换。

(2) 提取的外泌体如何保存?

短时间内使用, 可在 2~8℃ 短暂保存 1~2 天, 若长时间保存, 建议放在-80℃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。

(3) 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。

(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)。