

外泌体提取试剂盒 (牛奶)

Cat NO: IME-I003

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牛奶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

本说明书适用于从牛奶中纯化外泌体，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-I003	Solution A1	50 mL	常温，2 年
	Solution B	60 mL	
	Solution C	60 mL	

	Exosome Concentration Solution	120 mL	
	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、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、将生牛奶在 4℃下以 2000g 离心 5 min（注：离心后样品分为三层，上层为脂质层，下层为蛋白沉淀，**中间层为乳清**。离心后上层状态为“致密、稳定、不易脱落”，若上层“松软、易脱落”且下层沉淀较多，可重复此步骤，每次离心取中间层液体），以去除乳脂球和细胞，得乳清。

3、按体积比例为 10:1加入 Solution A1 2mL 至乳清中，混匀，从而得到黄色澄清液体，然后加入 Solution B 2.5 mL，将混合液被缓慢颠倒混匀后，直至固液分离并且液体部分为“透明状”。

4、4℃下以 10000g 离心 10min，取上清液转移至新离心管中，加入 2.5 mL Solution C 后颠倒混匀（注：Solution C 和 Solution B 加入剂量保持一致）。

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 20 mL 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（注：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，将样品以在 4℃以 10000g 离心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×PBS 重悬外泌体（建议每 500 μL 用 50~100 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，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）市售巴氏杀菌奶外泌体含量可能降低，建议使用生乳或低温处理乳。

（4）牛奶中蛋白酶活性高，预处理时需加入蛋白酶抑制剂（如 1mM PMSF）。

（5）孵育和离心步骤需在 4℃下进行，以保持外泌体的稳定性。

（6）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）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。

（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）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）。