

外泌体提取试剂盒

（血清或血浆）

Cat NO: IME-I002

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人和小鼠血清或血浆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

本说明书适用于从人和小鼠血清或血浆中纯化外泌体，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：冰袋运输，国内现货 2~3 天即可送达。
- （2）储存条件：Proteinase K -20℃储存，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-I002S	Proteinase K (20mg/mL)	0.1 mL	-20℃，2 年

	Exosome Concentration Solution	1 mL	常温，2 年
	Exosome Purification Filter	2 Tubes	
IME-I002M	Proteinase K (20mg/mL)	1 mL	-20℃，2 年
	Exosome Concentration Solution	6 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

全血预处理：

1、收集血液样本在有抗凝剂的收集管中，在 4℃ 2000g 离心 10min，收集上层液体，即血浆；或室温下自然凝集 30-60min，待血液凝固，在 4℃ 2000g 离心 10min，上清液即为血清。如果是冻存样本，在室温或 25℃水浴直至完全溶解。

2、将所需体积的澄清血浆（这里以 500 μL 为例，不满 500 μL 用PBS 补足）转移到新的2mL EP 管并加入等体积的 1 × PBS，混合样品，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，去除样品中的大囊泡，处理后的上清液转移到新离心管中。

去除杂蛋白：

注：通过蛋白酶 K 处理从血浆中去除大部分蛋白质，但这可能会导致外泌体表面的蛋白质部分降解。如果这对您的研究有影响，请跳过此步骤，直接进行外泌体提取。

向样品中加入 0.05 倍体积的蛋白酶 K，例如，对于 500 μ L 起始体积的血浆，添加 25 μ L Proteinase K。混匀样品，然后在 37°C 下孵育 10 min。

外泌体提取：

1、在处理后的离心上清液中按 4：1 加入 ECS，如 1 mL 上清液加入 0.25 mL 的 Exosome Concentration Solution (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°C 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，将样品在 4°C 以 10000g 离心 60min，移液吸出上清液并丢弃，尽量吸干液体。（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 μ L 血浆用 50~100 μ L 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°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）抗凝剂避免肝素（可能干扰下游 PCR 分析），推荐 EDTA 或柠檬酸钠。

（4）孵育和离心步骤需在 4°C 下进行，以保持外泌体的稳定性。

（5）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 2~8°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）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）。