# 操作指南

# Exo-spin™ mini

## 外泌体纯化试剂盒

适用于细胞培养基/尿液/唾液和其他蛋白含量低的生物体液

货号：EX01

Protocol Version 8.0

# 目录

产品组成 ..... 3
储存 ..... 3
通用外泌体提取信息 ..... 4
A. 细胞培养注意事项 ..... 4
B. 样本收集注意事项 ..... 4
C. 蛋白质组学分析 ..... 4
产品信息 ..... 4
使用 Exo-spin™ 纯化完整外泌体的方法 ..... 5
A. 去除细胞和细胞碎片 ..... 5
B. 沉淀外泌体组分 ..... 5
C. Exo-spin™ 纯化管柱的预处理 ..... 6
D. 外泌体的纯化 ..... 6
使用 Exo-spin™ 纯化脑脊液外泌体的方法 ..... 7
A. 脑脊液样本的准备 ..... 7
B. 沉淀外泌体组分 ..... 7
C. Exo-spin™ 纯化管柱的预处理和外泌体的纯化 ..... 7
使用 Exo-spin™ 纯化母乳外泌体的方法 ..... 7
A. 去除细胞和细胞碎片 ..... 8
B. 沉淀外泌体组分 ..... 8
C. Exo-spin™ 纯化管柱的预处理和外泌体的纯化 ..... 8
重复加样，管柱冲洗和储存 ..... 8
常见问题 ..... 9
外泌体研究的相关产品 ..... 10
参考文献 ..... 10

# Exo-spin™ mini

# 外泌体纯化试剂盒

## 产品组成

### EX01-8　Exo-spin™ mini kit（8 个管柱）

- 2 x Exo-spin™ 沉淀剂, 30 mL（共 60 mL）
- 8 x Exo-spin™ 纯化管柱，含废液收集管
- 1 x PBS（不含钙镁离子）, 7 mL
- 1 x 操作指南

### EX01-25　Exo-spin™ mini kit（24 个管柱）

- 1 x Exo-spin™ 沉淀剂, 250 mL
- 24 x Exo-spin™ 纯化管柱，含废液收集管
- 1 x PBS（不含钙镁离子）, 30 mL
- 1 x 操作指南

### EX01-25L　Exo-spin™ mini kit（24 个管柱）

- 2 x Exo-spin™ 沉淀剂, 250 mL（共 500 mL）
- 24 x Exo-spin™ 纯化管柱，含废液收集管
- 1 x PBS（不含钙镁离子）, 30 mL
- 1 x 操作指南

### EX01-50　Exo-spin™ mini kit（48 个管柱）

- 2 x Exo-spin™ 沉淀剂, 250 mL（共 500 mL）
- 48 x Exo-spin™ 纯化管柱，含废液收集管
- 2 x PBS（不含钙镁离子）, 30 mL（共 60 mL）
- 1 x 操作指南

所有试剂盒均不提供大容量（15 mL 或 50 mL）离心管和 1.5 mL 微量离心管。

## 储存

**收到产品后, 4°C 储存纯化管柱和 Exo-spin™ 沉淀剂。**

其余组分室温储存（15°C – 25°C）。

正确储存的产品组分能够在购买后至少稳定保存 3 个月。

## 通用外泌体提取信息

### A. 细胞培养注意事项

细胞培养用的胎牛血清（FBS）含有大量的外泌体，细胞培养实验应使用去外泌体血清，可购买商业化的去外泌体血清（VivaCell，C3801-0050）。或者使用 Vivaspin® 20-100 kDa MWCO 聚醚砜（GE Healthcare）或 Amicon® Ultra-15 离心过滤装置（Millipore）可以有效地去除用 PBS 1:1 稀释的 FBS 中的外泌体。

从细胞培养液收获的外泌体数量取决于多种因素，包括特定的细胞株、细胞培养时间以及细胞密度。癌细胞株会比未转化的细胞株产生更多的外泌体。

### B. 样本收集注意事项

纯化前的样本收集和处理可能对纯化外泌体的质量有重要影响（Witwer *et al.*, 2013）。

### C. 蛋白质组学分析

沉淀剂会干扰质谱分析，因此如果要进行质谱分析，在纯化外泌体时不应使用沉淀剂。这种情况下，在使用 Exo-spin™ 纯化管柱之前，应该使用其他浓缩方法来代替沉淀法。

## 产品信息

Exo-spin™ 技术结合沉淀法和尺寸排除色谱法(SEC)，使其优于单纯依赖沉淀的技术——结合法可以同时纯化大量非外泌体蛋白和其他物质，以及残留的沉淀剂。Exo-spin™ 技术分离的外泌体可用于多种下游应用，包括 DNA 和 RNA 研究，以及体外和体内外泌体功能分析。

本试剂盒可以处理不同类型的样本，每个管柱起始体积从小于 1 mL 到 50 mL，包括细胞培养基、唾液、尿液和其他蛋白含量低的生物体液。体积小于 1 mL 的样本可以用 PBS 稀释成 1 mL 终体积，但外泌体浓度可能较低。

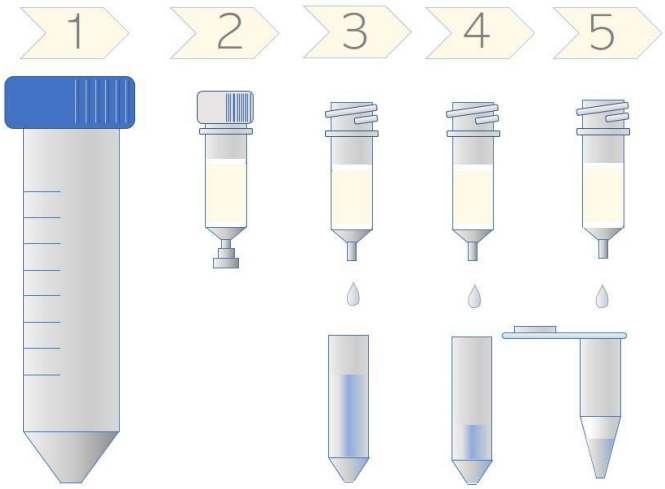
**有关外泌体提取的更多信息，请访问我们的网站。有关脑脊液和人母乳样本，推荐使用说明请参见第 7、8 页。**

## 使用 Exo-spin™ 纯化完整外泌体的方法

提供的 Exo-spin™ 纯化管柱使用含 20%乙醇的超纯水预平衡，请在使用管柱之前再用 PBS 重新平衡。

每根纯化管柱的起始样本量最多为 50 mL；若起始样本量≥50 mL，请用多根纯化管柱操作。请注意，如果所有纯化管柱所处理的起始样本体积都为上述最大体积，则需要额外购买 Exo-spin™ 沉淀剂（Cat No. EX06-30（30 mL）或 EX06-250（250 mL））。

除了特殊情况，所有离心操作都可以在室温或 4°C进行。




操作流程

### A. 去除细胞和细胞碎片

1. 将 1-50 mL 的起始样本置入离心管（未随试剂盒提供），以 300 *x g* 离心 10 min 去除细胞和细胞碎片。
2. 将离心后的上清液置入新的离心管并以 16,000 *x g* 离心 30 min 去除剩余的细胞碎片。

### B. 沉淀外泌体组分

3. 将离心后的上清液置入新离心管中，并以 2:1 的比例加入 Exo-spin™ 沉淀剂。（例如，上清液体积为 10 mL，则加入 5 mL 的 Exo-spin™ 沉淀剂。）
4. 上下倒置离心管数次将溶液混匀，并在 4°C孵育至少 1 h。

**或者，混合液在 4°C 孵育过夜，这可能会小幅加外泌体的产量。**

5. 取出混合液以 16,000 *x g* 离心 1 h。

6. 小心吸出并弃去上清液。
   **注意不要让沉淀物干燥，以免对外泌体造成损害。**

7. 用 100 µL PBS（随试剂盒提供）重悬含有外泌体的沉淀。

## C. Exo-spin™ 纯化管柱的预处理

**备注 1: Exo-rack 是 Cell Guidance Systems 提供的专用支架，用于固定 mini 和 mini-HD 柱，并简化纯化管柱的操作。**

**备注 2: 这是一个显著更新的简化方案，可产生出色的结果，并确保与 Exo-spin 96 孔板中纯化样本的一致性。**

8. 提前准备好 Exo-spin™ 纯化管柱。

   a) 使用前在室温下回温 15 min 以平衡纯化管柱。

   b) **先移除 Exo-spin™ 纯化管柱底部管塞，再取下顶部的螺旋盖，**并将纯化管柱置入试剂盒提供的废液收集管中。

   c) 使用移液枪从纯化管柱顶部吸弃防腐保存液；为防止柱床干燥，请立即进行下一步操作。

   d) 加入 250 µL PBS 缓冲液，让液体在重力作用下进入柱基质中，丢弃流出的缓冲液。

   e) 在继续下一步骤前重复步骤 8d 一次。

## D. 外泌体的纯化

9. 小心将步骤 7 的 100 µL 外泌体重悬液加入纯化管柱顶端，然后将管柱放入废液收集管中。

10. 让液体在重力作用下进入柱基质中，丢弃流出液。

11. 将纯化管柱置入新的 1.5 mL 离心管以收获外泌体；将 180 µL 的 PBS 加入纯化管柱顶端，并通过重力洗脱。

12. 确保纯化管柱中液体已完全洗脱。可以通过轻轻敲击管的侧面收集挂在管柱下的液滴。

13. 从样本收集管中取出 Exo-spin™ 纯化管柱。

14. 将含有分离外泌体的样本收集管以 100 *x g* 短暂离心 30 s，以便将所有液体收集到管底部，分离的外泌体即可用于下游应用。

## 使用 Exo-spin™ 纯化脑脊液外泌体的方法

该使用手册改编自 Martins *et al.*, 2018.

### A. 脑脊液样本的准备

1. 脑脊液样本 1000 *x g* 离心 5 min。
2. 将上清液转移到新的微量离心管中（未随试剂盒提供），并在 4°C，16,000 *x g* 离心 30 min。每个纯化管柱可纯化 5 mL 脑脊液样本。

### B. 沉淀外泌体组分

3. 将离心后的上清液置入新离心管中，并以 2:1 的比例加入 Exo-spin™ 沉淀剂。（例如，上清液体积为 10 mL，则加入 5 mL 的 Exo-spin™ 沉淀剂。）
4. 上下倒置离心管混匀，4 °C 孵育过夜。
5. 取出混合液以 16,000 *x g* 离心 1 h。
6. 小心吸出并弃去上清液。
   **注意不要让沉淀物干燥，以免损坏外泌体。**
7. 用 100 µL PBS（随试剂盒提供）重悬含有外泌体的沉淀。

### C. 使用 Exo-spin™ 纯化管柱的预处理和外泌体的纯化

按照第 6 页上的步骤 8 至 14 使用 Exo-spin™ 柱从脑脊液中纯化外泌体。

## 使用 Exo-spin™ 纯化母乳外泌体的方法

本方法改编自 Rodrigues-Amorim D, Rivera-Baltanás T, Rodriguez Jamardo C, Fernández Palleiro P, Olivares JM and Spuch C from the Translational Neuroscience Research Group, Galicia Sur Health Research Institute. University of Vigo, CIBERSAM, Spain.

### A. 去除细胞和细胞碎片

1. 将 7.5 mL 起始样本转移到 15 mL 离心管（未随试剂盒提供），并以 300 *x g* 离心 10 min 以去除细胞。

2. 将上清液转移到新的离心管中，16,000 *x g* 离心 30 min 以去除其它剩余的细胞碎片。
   **转移整个上清液，包括乳脂层。**

### B. 沉淀外泌体组分

3. 将上清液转移到新的离心管中，以 1:1 的比例加入 Exo-spin™ 沉淀剂（例如，将 7.5 mL Exo-spin™ 沉淀剂添加到 7.5 mL 上清液中）。

4. 颠倒试管混匀，并使用试管旋转器 4°C 孵育过夜。

5. 取出混合液以 16,000 *x g* 离心 1 h。

6. 小心吸出并弃去上清液。
   **注意不要让沉淀物干燥，以免损坏外泌体。**

7. 用 100 µL PBS（本试剂盒提供）重悬含有外泌体的沉淀。

### C. Exo-spin™ 纯化管柱的预处理和外泌体的纯化

按照第 6 页上步骤 8 至 14 使用 Exo-spin™ 纯化管柱纯化母乳外泌体。

## 重复加样，管柱冲洗和储存

**对于大于 100 µL 的非浓缩（例如沉淀）样本，最多可以重复加入 500 µL 样本。纯化第一批的 100 µL 样本后，只需用 PBS 冲洗管柱即可去除管柱中的游离蛋白质，可以在同一管柱上纯化剩余的样本。**

- 在上述步骤 11（C 部分）之后，添加 4 x 200 µL（共 800 µL）PBS，以去除所有游离蛋白质（由 Bradford 测定）。
- 之后，可以通过重复上述步骤 4-11，纯化更多的（或新的）外泌体样本。
- 如果需存放纯化管柱以备以后使用，请使用 20%乙醇代替 PBS 进行冲洗。

备注：如果重复使用纯化管柱，液体流速可能会降低。

## 常见问题

### 我的样本没有从纯化管柱中洗脱出来。

- 确保出液口管塞已从纯化管柱底部拔下。在拧开管柱旋盖之前，必须先取下管塞。

### 我的样本中包含的外泌体数量低于预期。

- 确保纯化管柱在实验过程中未变干燥。
- 遵守指示体积向纯化管柱中添加样本。如果样本体积太小，外泌体将滞留在管柱内。
- 确保含外泌体的样本在 4 °C 沉淀至少 1 h，并且 Exo-spin™ 缓冲液已与样本正确混合。
- 外泌体产量取决于多种因素，尤其是初始样本的生物体液类型。如果使用培养基，存在的外泌体的数量将根据细胞系和细胞培养时间的长短而有很大差异。

### 我的样本没有可测量的外泌体。

- 这很可能是由于纯化管柱完全干燥导致功能丧失造成，请确保管柱保持湿润状态（上层保护液或 PBS）。

### 我可以增加洗脱体积吗?

- 不推荐这样做，因为它会导致大量的非外泌体蛋白质的共洗脱，这些蛋白质会在外泌体之后从管柱中洗脱。

### 我没有超速离心机。

- 通过计算推荐速度与离心机速度的比例来增加离心的时间。例如，如果使用说明建议以 16,000 x *g* 离心 30 min，对于最大速度为 9,500 x *g* 的离心机：16000/9500=1.68，则离心时间为 1.68*30 min = 50.4 min。

## 外泌体研究的相关产品

| 相关产品 | 产品描述 | 货号 |
| --- | --- | --- |
| 外泌体检测 | 外泌体抗原，抗体 | EX201，EX202，EX204，EX203 |
| | TRIFic™ 检测 | EX101，EX102，EX103 |
| 纳米颗粒追踪分析（NTA） | ZetaView NTA 纳米颗粒追踪服务 | T81010001 |
| 分离专用支架 | 专用支架，用于固定 mini 和 mini-HD 柱，并简化纯化管柱的操作 | EX10-S，EX10-L |

### TRIFic™ 检测

TRIFic™ 外泌体检测类似于 ELISA，但存在一些显著差异。与 ELISA 不同，没有酶促反应，而是使用铕标签直接检测目标蛋白。TRIFic™ 外泌体检测可从纯化或未纯化的样本中提供清晰、一致和定量的数据，包括以方便的 96 孔板形式直接测量血浆中的外泌体。TRIFic™ 外泌体检测可用于广泛使用的外泌体标志物，即跨膜蛋白 CD9、CD63 和 CD81。

### ZetaView NTA 纳米颗粒追踪服务

使用 Particle Metrix 的 ZetaView 仪器进行外泌体粒径和数量的分析。

### Exo-rack

Exo-rack 专门设计用于 Exo-spin™ mini（货号：EX01、EX02、EX03）和 Exo-spin™ mini-HD 产品（货号 EX05）。支架由三种不同的材料制成：生物塑料、碳纤维增强塑料和丙烯酸，具有创新的软柱夹持装置，可将每根管柱牢牢固定到位。

管柱夹允许将管柱从侧面插入支架，从而能够根据需要快速设置和轻松调整高度。

## 参考文献


- Witwer KW. *et al*. *J Extracell Vesicles*. 2013, 2: 10.3402/jev.v2i0.20360.
- Martins TS. *et al*. *PLoS One*. 2018, 13(6): e0198820

Cell Guidance Systems'reagents and services enable control, manipulation and monitoring of the cell, both *in vitro and in vivo*.

## Growth Factors

- Recombinant
- Sustained Release

## Matrix Proteins

## Exosomes

- Purification
- Detection
- Tracking
- NTA Service

## Small Molecules

Shanghai XP Biomed Ltd.
上海逍鹏生物科技
Cell Guidance Systems 独家代理

更多产品资讯，请关注逍鹏生物微信公众号

电话：021-58785545
邮箱：info@xpbiomed.com
网址：www.xpbiomed.com
地址：上海市浦东新区祖冲之路 1505 弄 80 号 1 幢 3 楼