操作指南

Exo-spin™ mini blood

外泌体纯化试剂盒

适用于血清/血浆样本

货号：EX02

Protocol Version 7.0

操作指南

产品组成 3
储存 3
通用外泌体提取信息 4
A. 血液类样本收集注意事项 4
B. 蛋白质组学分析 4
产品信息 4
使用 Exo-spin™ blood 纯化血清/血浆外泌体的方法 4
A. 去除细胞和细胞碎片 5
B. 沉降外泌体组分 5
C. Exo-spin™ 纯化管柱的预处理 6
D. 外泌体的纯化 6
重复加样，管柱冲洗和储存 6
常见问题 7
外泌体研究的相关产品 8
TRIFic™ 检测 8
ZetaView NTA 纳米颗粒追踪服务 8
参考文献 8

Exo-spin™ mini blood

外泌体纯化试剂盒

产品组成

EX02-8 Exo-spin™ mini blood kit (8 个管柱)

- 1 x Exo-spin™ 沉淀剂, 2 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

EX02-25 Exo-spin™ mini blood kit (24 个管柱)

- 1 x Exo-spin™ 沉淀剂, 15 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

EX02-50 Exo-spin™ mini blood kit（48 个管柱）

- 1 x Exo-spin™ 沉淀剂, 30 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. 血液类样本收集注意事项

纯化前的样本收集和处理可能对纯化外泌体的质量产生重要影响（Witwer *et al.*, 2013）。血清中含有许多在凝块形成后释放的血小板衍生的外泌体，由于可能对下游应用（例如 PCR）产生影响，因此不推荐使用基于肝素的抗凝剂。

血小板衍生的外泌体可能会通过与采血过程相关的物理力从血小板中释放出来。建议对采样点、针管规格（越宽越好）和其他变量进行标准化。为确保样本不被皮肤成纤维细胞污染，有人建议应丢弃最初的几毫升血液。

收集的血液应轻拿轻放并迅速处理（抽血后 30 min 内）。

B. 蛋白质组学分析

沉淀物会干扰质谱分析，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。在这种情况下，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。

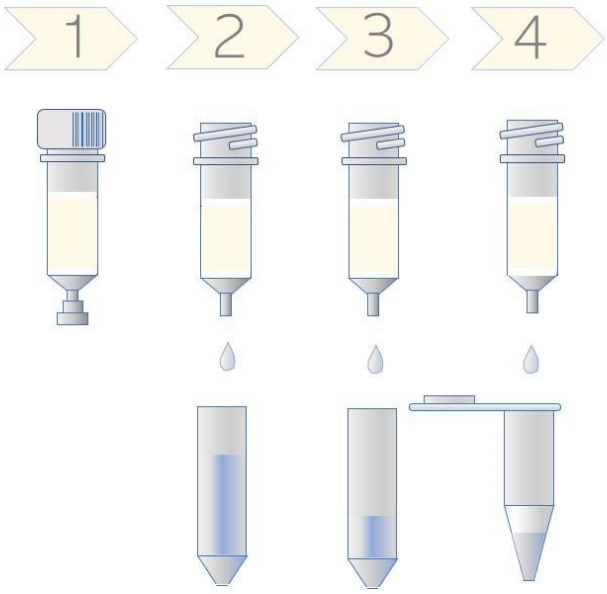
本试剂盒可以处理血液类样本，每个管柱的起始体积为 100-500 µL（血清）或 100-250 µL（血浆）。体积小于 100 µL 的样本应使用 PBS 稀释至终体积 100 µL，但外泌体浓度可能会较低。

使用 Exo-spin™ blood 纯化血清/血浆外泌体的方法

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。

该管柱设计用于从 100 µL 液体中洗脱外泌体。体积小于 100 µL 的样本应使用 PBS 稀释至终体积 100 µL。超过 100 µL 的样本体积需要通过 Exo-spin™ 沉淀剂来浓缩：每根纯化管柱最大起始样本体积为 500 µL 血清或 250 µL 血浆，沉淀的外泌体在上样前重悬于 100 µL PBS 中。对于更大的样本体积，每个样本需使用更多的纯化管柱或 Exo-spin™ midi 纯化管柱（货号 EX04-5/-20）。

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. 将起始血样（100-250 µL 血浆或 100-500 µL 血清）转移至 1.5 mL 微量离心管（未随试剂盒提供）并以 300 x *g* 离心 10 min 以去除细胞。

2. 将离心后的上清液置入新的离心管并以 16,000 x *g* 离心 30 min。
   对于 100 µL 血清或血浆样本，可以跳过沉淀步骤 3-7，并直接进行 C 部分。如果不需要沉淀操作，则可以单独购买 Exo-spin™ 纯化管柱。

B. 沉降外泌体组分

注意：沉淀剂会干扰下游应用中的质谱分析。

3. 将上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中，以 1:2 的比例加入 Exo-spin™ 沉淀剂（例如，将 250 µL Exo-spin™ 沉淀剂添加到 500 µL 上清液中）。

4. 颠倒离心管混匀，并在 4°C 孵育至少 5 min。
   （或者，样本可以在 4°C 下孵育 1 h，这可能会小幅增加外泌体的产量）

5. 将混合液以 16,000 x *g* 离心 30 min。
   （或者，可以将样本离心 1 h，这可能会小幅增加外泌体的产量）

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。
   （如果沉淀不易重悬，请在 37°C 下加热 10 min；如果沉淀仍然难以重悬，请参阅第 7 页的常见问题部分）

C. Exo-spin™ 纯化管柱的预处理

8. 上样前准备好 Exo-spin™ 纯化管柱。

   a) 使用前在室温下回温 15min 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。

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子中的游离蛋白质，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。
- 确保含有外泌体的样本在 4 °C 沉淀至少 5 min，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。

我的沉淀在沉淀步骤后特别难以重悬，该怎么做？

- 执行以下步骤：
  a) 将沉淀以 1,500 x *g* 离心 30 min，而不是按照步骤 5 中的说明以 16,000 x *g* 离心。
  b) 吸出上清液。
  c) 在 37°C 下孵育沉淀 10 min。
  d) 将温热的 PBS 加入到沉淀中使其溶散。
  e) 使用切割至大约 1/3 的移液枪头重新悬浮沉淀物，以防止沉淀物阻塞移液器枪头。
- 如果有必要，可以降低起始体积以更容易地重悬沉淀。

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。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.

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