操作指南

Exo-spin™mini 管柱

外泌体纯化试剂盒

适用于血清、细胞培养基和已标记的外泌体样本

货号：EX03

Protocol Version 3.7

目录

Exo-spin™ mini columns

外泌体纯化试剂盒

产品组成

EX03-8 Exo-spin™ mini 管柱试剂盒（8 个管柱)

- 8 x Exo-spin™ 纯化管柱，含废液收集管
- 1 x 操作指南

EX03-25 Exo-spin™ mini 管柱试剂盒（24 个管柱)

- 24 x Exo-spin™ 纯化管柱，含废液收集管
- 1 x 操作指南

EX03-50 Exo-spin™ mini 管柱试剂盒（48 个管柱)

- 48 x Exo-spin™ 纯化管柱，含废液收集管
- 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。

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 30min 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。但是，EX03 试剂盒仅包含 SEC 管柱，因为某些应用（例如质谱下游应用和≤100 µL 血清类样本量）不需要沉淀步骤。

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。

本试剂盒每个管柱可以处理≤100 µL 的血清样本，体积小于 100 µL 的样本应使用 PBS 稀释至终体积 100 µL。

该使用说明是基于离心技术的。如果首选基于重力方法的也可以使用 Exo-spin™ mini-HD 色谱柱（货号 EX05）作为替代。

Exo-spin™ mini 管柱可用于纯化已通过其他方法（如沉淀法和超速离心法）纯化的样本，以去除蛋白质和较小的分子。Exo-spin™ 管柱对于已标记外泌体样本的纯化也非常有效。

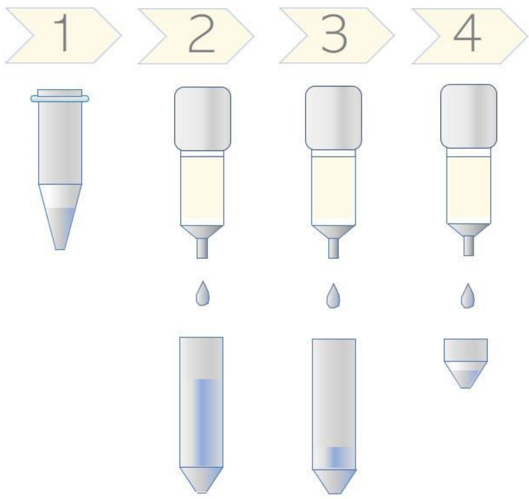
使用 Exo-spin™ mini 管柱纯化完整外泌体的方法

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。

每个纯化管柱最多可上样 100 µL 血清。对于较大体积的样本，每个样本应使用多个纯化管柱。

对于含有细胞的典型样本，例如血清，在纯化外泌体之前，必须首先执行额外的操作步骤以去除细胞和细胞碎片。**对于不含细胞的二次样本的清理，可以省略此步骤。**

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：（1）离心沉淀细胞（2）平衡管柱（3）上样（4）纯化外泌体

A. 去除细胞和细胞碎片

1. 将 100 µL 起始样本转移到离心管（未随试剂盒提供）中，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以 16,000 x *g*，30 min 以去除剩余的细胞碎片。

3. 将上清液转移到新的离心管中，必要时通过添加 PBS 使样本总体积为 100 µL。

B. Exo-spin™ mini 纯化管柱的预处理

4. 上样前准备 Exo-spin™ mini 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) 在继续下一步之前重复步骤 4d 一次。

C. 外泌体的纯化

5. 将步骤 3 的 100 µL 外泌体重悬液加入纯化管柱，然后将管柱放入废液管上。

6. 以 50 x *g* 离心 60 s，丢弃流出液。

7. 将管柱放入 1.5 mL 微量离心收集管中，加入 200 µL PBS。

8. 以 50 x *g* 离心 60 s 以洗脱纯化的外泌体。

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，再添加 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

我的样本没有从色谱柱中洗脱出来。

- 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。
- 如果以过快的速度离心纯化管柱，将损坏管柱并无法正常使用。请注意，某些离心机无法提供所需的低速。

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。任何时间过长或速度过高的离心都可能导致色谱柱变干。高速离心也可能压缩纯化管柱中的树脂，使得效率低下。
- 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。
- 外泌体产量取决于多种因素，尤其是起始材料的生物样本的类型，并且可能因患者而异。

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。可以使用 EX05 Exo-spin™ mini-HD 作为替代，该方法将是基于重力作用进行，至少可以收集两个组分为 200 µL 的样本用于进一步的下游分析。

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。

我没有低速离心机。

- 以 50 x *g* 离心很重要，因为即使在 100 x *g* 时管柱内的树脂也很容易被压缩。使用合

适的离心机进行离心，例如 CappRondo 微量离心机（Capp®, CR-68X)。

- 作为替代方案，可以使用 EX05 Exo-spin™ mini-HD，该方法将是基于重力作用进行，至少可以收集两个组分为 200 µL 的样本用于进一步的下游分析。

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

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