

产品使用说明书

SuperEV™ 超纯分子排阻色谱柱

SuperEV™ Ultrapure Columns

Cat.# EXOSEC3.0-2

辽宁润基生物科技有限公司

Liaoning Rengen Biosciences Co.,Ltd

Version 1.0

15/8/2019

目录

保存和应用	2
产品介绍	3
试剂盒组成和说明	4
操作方法	4
实验数据分析	7
相关产品信息	9
简略操作方法.....	10
技术支持	12

保存与应用

【保存条件】

常温或 4℃ 运输，收到试剂盒后直立放置，置于 2-8℃ 保存，有效期 12 个月。**请勿冷冻！**

【应用范围】

本产品只用于科学研究，不能用于临床诊断。

1. 本产品是基于尺寸排阻色谱原理，根据被分离组分的分子大小实现胞外囊泡（EVs）的分离和纯化。
2. 适合大部分生物样品（血清、血浆、尿液等）和细胞培养上清中分离和纯化 EVs。
3. 分离的 EVs 可用于鉴定（NTA, TEM, FACS 和 Western Blot），蛋白质谱分析，RNA 提取和测试，高通量测序，体外标记和修饰及细胞实验等。

产品介绍

外泌体(Exosome)是由不同细胞分泌的直径 30-150nm 的胞外膜性囊泡 (Extracellular Vesicles, EVs)。外泌体普遍存在于多种体液中，其内容物丰富，包括蛋白质、脂质和核酸等，在细胞间信息交流中发挥着重要作用，主要参与免疫抗原呈递，神经递质传递，脂类代谢及细胞信号转导等过程，并与多种疾病的发生、发展、治疗及预后密切相关。

尺寸排阻色谱法 (Size Exclusion Chromatography, SEC) 被认为是从不同样本中分离和纯化细胞外囊泡 (EVs) 的最佳方法之一，因为它能够快速而有效地将 EVs 从复杂样本中分离出来，并能保持 EVs 的原始形状和生物学功能。我们开发了用于分离 EVs 的不同类型的 SEC 柱：**SuperEV0.5**，**SuperEV1.0** 和 **SuperEV3.0**，适合不同样本和体积的 EVs 分离。此外，我们还提供 SEC 柱和浓缩柱的不同组合，既可以从更大体积的细胞培养上清或尿液中分离 EVs，同时又可以 将 SEC 柱分离的 EVs 进一步浓缩和纯化，提供完整的纯净 EV 的解决方法，适合于 EVs 的工业化制备。

【主要特性】

SuperEV 3.0 超纯色谱柱	上样体积	最多 4.0mL，最佳 3.0mL*
	柱床体积	42mL
	馏分体积	2.0mL
	空隙体积	14.5mL
	冲洗体积	65mL
	EVs 收集体积	8.0mL
	操作温度	18-28℃
	缓冲液	PBS
	稳定工作的 pH 范围	3-13
	有效期	12 个月

* 建议样品上样量为 3.0mL，以获得高纯度和高回收率的 EVs，上样量最高可达 4.0mL，但后面馏分的 EV 纯度略有下降，具体参考“实验数据分析”中样品上样体积研究。

【主要特点】

- 耗时短，分离时间约 **15** 分钟。
- 操作简便，无需特殊设备。
- 重复性好，可重复使用 **5** 次。
- 操作温和，最大程度保持胞外囊泡（EVs）完整形态结构和生物学功能；
- 回收率高，大于 **82%**。
- 纯度高，总蛋白去除约 **99.9%**，脂颗粒去除约 **90%**。
- 操作过程仅加入 PBS 缓冲液，对下游实验无干扰。

试剂盒组成和说明

组分名称	数量	保存温度
SuperEV 3.0 超纯色谱柱	2 支/盒	2-8℃

需自备试剂

1. PBS 缓冲液，经 0.22μm 滤膜过滤
2. 纯水，经 0.22μm 滤膜过滤
3. 20%乙醇水溶液
4. 超滤管（截留分子量为 100KD）
5. 收集管（烧杯，普通离心管）

操作方法

1. 柱平衡

从冰箱中取出 SuperEV3.0 超纯柱，垂直固定，若无合适的垂直固定装置，可从我公司购买配套的固定组件（货号：**HCS1060**）。室温放置至少 30 分钟，使柱子温度充分平衡到室温（18-28℃），温度过高过低，柱体可能会引入气泡，影响分离效果。使用的 PBS 缓冲液，同样平衡至室温。

注意：

- 柱子平衡至室温前，不要打开顶盖和底盖。
- 柱子第一次使用，上筛板与填料表面可能存在间隙，这是储存过程中填料沉降造成的，不影响分离性能，实验前将筛板向下垂直推到填料表面即可。

- 尽量用当天新配的 PBS, 经 0.22 μ m 膜过滤, 避免引入微生物和颗粒物, 以免堵塞筛板。

将收集管（烧杯或普通离心管）放置在柱子下方, 先打开顶盖, 用移液器吸弃上方的保存液, 加入约 20mL 超纯水（经 0.22 μ m 滤膜过滤）, 取下底盖冲洗柱子, 待液体全部进入筛板, 出口无液体流出, 继续加入 60mL PBS 冲洗。整个冲洗过程始终保持顶部筛板湿润, 避免柱体变干。冲洗完成后, 盖上底盖, 加入少量 PBS 等待后续操作。

2. 样品处理

样品上样量

样品类型	上样量
血清或血浆	最大 4.0mL, 最佳 3.0mL
浓缩的细胞培养上清或尿液	

样品处理

样品类型	操作步骤
血清、血浆	<ul style="list-style-type: none"> ● 5,000\timesg 离心 20 分钟, 取上清 ● 0.45-0.80μm 滤膜过滤
细胞培养上清	<ul style="list-style-type: none"> ● 3,000\timesg 离心 20 分钟, 取上清 ● 可选择截留分子量为 100KD 超滤管浓缩 20 倍, 浓缩液蛋白浓度不得高于 100ug/uL ● 或采用我公司“细胞培养上清外泌体浓缩试剂盒(EXOCCon40-10)”浓缩 20 倍, 最高可浓缩 50 倍
尿液	<ul style="list-style-type: none"> ● 3,000\timesg 离心 20 分钟, 取上清 ● 可选择截留分子量为 100KD 超滤管浓缩 20 倍, 浓缩液蛋白浓度不得高于 100ug/uL ● 或采用我公司“尿液外泌体浓缩试剂盒(EXOUCon40-10)”浓缩 20 倍, 最高可浓缩 50 倍

3. 样品上样和 EVs 收集

用移液器吸弃筛板上方的 PBS, 取下柱子底盖, 在筛板上方加入不超过 4.0mL（最适 3.0mL）的样品, 柱子下方放置 15mL 离心管进行第 1 馏分的收集。待样品全部进入筛板后, 再加入一定量的 PBS（PBS 量=14.5mL-样品上样量）。待液体全部进入筛板下方, 出口无液体流出, 收集完毕。收集的第 1 馏分为空隙

体积，大约 14.5mL，该馏分不含 EVs。

注意：

- 加入样品后，必须等所有样品进入筛板后，才能继续加入 PBS，避免样品被稀释。
- 加入 PBS 的量为 14.5mL-样品上样体积，如上样量为 3.0mL 时，加入 PBS 11.5mL，上样量为 4.0mL 时，加入 PBS 10.5mL。

继续加入 PBS 进行洗脱，用 2mL 离心管收集馏分。每次加入 2mL PBS，待洗脱液全部进入筛板后，出口无液体流出时，该馏分收集完毕。再加入下一个 2mL PBS 进行收集。每个馏分收集体积为 2.0mL。EVs 主要集中在馏分 2-5，总体积约为 8.0mL。

注意：

- 整个洗脱过程始终保持顶部筛板湿润，避免柱体变干。
- 不同类型样品可能会有不同的洗脱谱和纯度，建议初次使用时，对收集的馏分做 EVs 和蛋白浓度测定。

4. 柱体冲洗

含 EVs 的馏分收集完毕后，用不少于 65mL 的 PBS 对柱体进行冲洗，冲洗后的柱子可直接用于下一个样品处理，或加入保存液，2-8℃ 储存。

保存液：20%乙醇或 0.05% (W/V) 叠氮钠水溶液。

注意：当分离的 EVs 馏分用于 RT-PCR 或高通量测序时，为避免交叉污染，建议一根柱子只用一次或仅重复用于同一样品。

5. 清洗和再生

变性蛋白或脂蛋白在柱子冲洗过程中可能无法完全被洗脱，积累过多会对分离的纯度产生影响，可按以下方法进行再生：40 mL 0.5M NaOH 清洗，然后用 PBS 冲洗柱子，直至流出液 pH 为中性，一般需 80-120mL PBS 缓冲液。

注意：当柱子颜色有变化或流速明显下降时，建议进行清洗和再生。

6. EVs 馏分浓缩 (富集)

收集到的 EVs 馏分可做 EVs 浓度和蛋白浓度直接测定，根据实验需要决定是否浓缩或富集。若需要浓缩或富集，建议采用截留分子量为 100KD 超滤管，2,000×g 离心浓缩，如 Millipore Amicon Ultra-15ml (MWCO 100kD) 或 Sartorius Vivaspin 15 ml (MWCO 100kD)，也可从我公司直接购买配套的 15mL 超滤管 (货

号：HCF10050）或“细胞培养上清外泌体浓缩试剂盒”进行浓缩。

实验数据分析

1. 血清过 SuperEV3.0 柱洗脱峰及样品上样体积的研究

将 3.0mL 处理的血清加入 SuperEV 3.0 柱，收集馏分 1 (14.5mL) 和另外 13 个馏分 (2.0mL/馏分)。采用 CD63×CD9 双抗夹心 ELISA 法测定 EVs 浓度，BCA 法测定蛋白浓度。从图 1 看出，EVs 主要集中在馏分 2-5；从馏分 8 开始，蛋白逐渐被洗脱出，馏分 14 左右达到顶峰。

当上样体积增加时，外泌体洗脱会有拖尾现象，各馏分的蛋白浓度有所增加，EVs 馏分纯度略有下降。因此考虑 EVs 的纯度和回收率，最大上样体积为 **4.0mL**，最佳的上样体积为 **3.0mL**，这样不仅回收率高，纯度也最高。

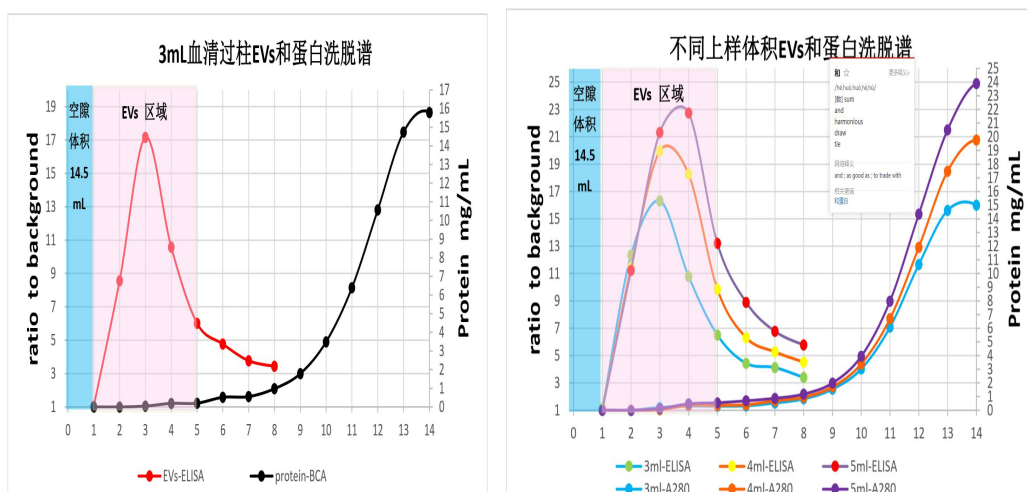


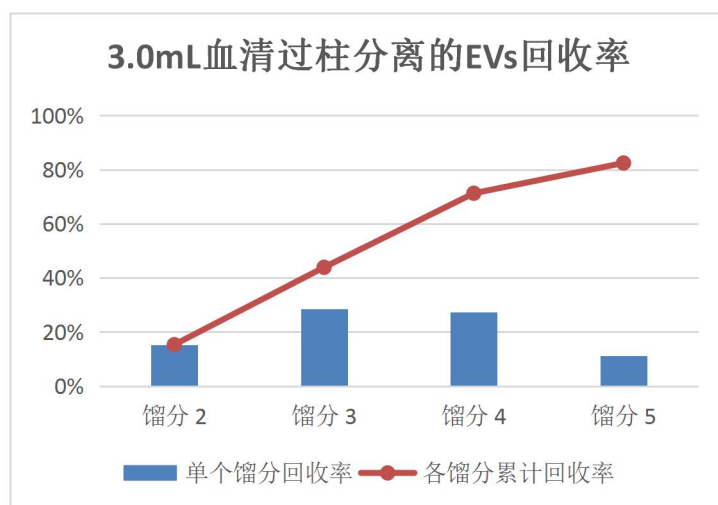
图 1 (a) 3.0mL 血清过 SuperEV 3.0 柱的 EVs 和蛋白洗脱谱；图 1 (b) 不同体积血清上样（3.0mL，4.0mL，5.0mL）过 SuperEV 3.0 柱时 EVs 和蛋白洗脱谱。

2. 回收率和稀释度

使用已知浓度的外泌体冻干粉作为标准品，按不同比例进行稀释并制作 ELISA 标准曲线，同时检测馏分 2-5 和对应的血清样品。根据标准曲线计算馏分 2-5 和血清的 EVs 浓度。

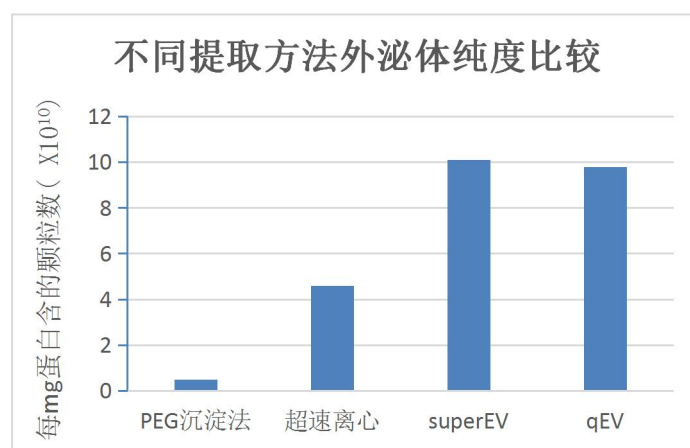
收集馏分 2 和 3，稀释度为 1.33，回收率为 **43.8%**；收集馏分 2-4，稀释度为 2，回收率为 **71.2%**；收集馏分 2-5，稀释度为 2.67，回收率可达到 **82.4%**。

收集的馏分数目越多，回收率越高，但稀释度越大，EVs 纯度也会相应降低。



3. 纯度分析

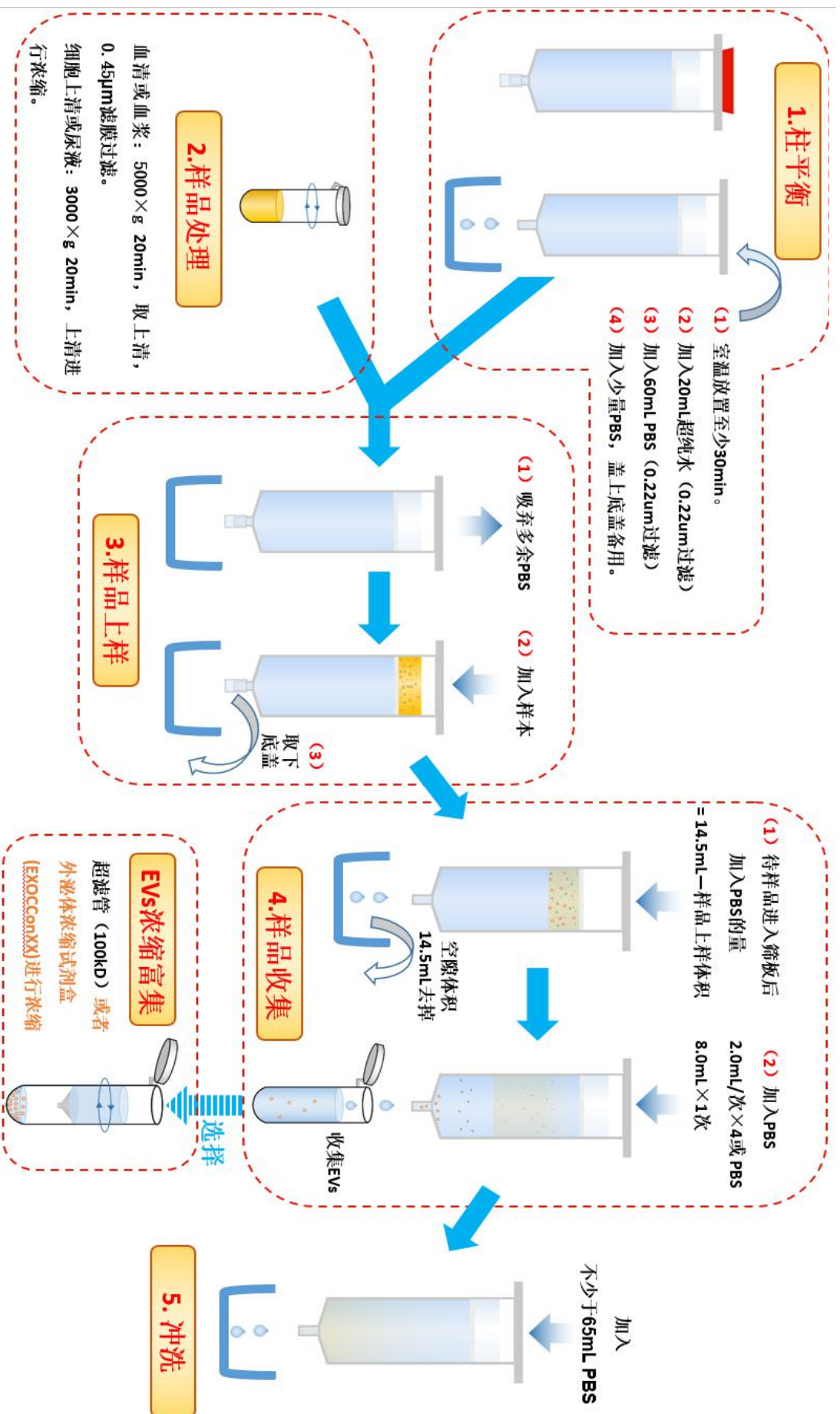
以每 mg 蛋白质对应的颗粒浓度 (particles/mg) 评估各提取方法分离的 EVs 纯度，superEV3.0 柱分离的 EVs 纯度明显高于沉淀法和超速离心法。



相关产品信息

相关产品	目录号
外泌体提取试剂盒(血清/血浆)	EXORG50A-1/ EXORG30A-1
外泌体浓缩试剂盒 (细胞培养上清/尿液)	EXOCCon10-10/ EXOUCon10-10
外泌体 DNA 分离试剂盒	EXODNA50C-1/ EXODNA30C-1
外泌体 RNA 分离试剂盒	EXORNA50C-1/ EXORNA30C-1
DiO-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (green)	EXOPDiO10-1/ EXOPDiO20-1
DiI-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (red)	EXOPDiI10-1/ EXOPDiI20-1
DiR-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (red)	EXOPDiR10-1/ EXOPDiR20-1
PKH67-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (green)	EXOPPKH67-10/ EXOPPKH67-20
外泌体 Markers 检测试剂盒 (Western Blot)	EXOWBxx-5
外泌体捕获和定量试剂盒 (ELISA)	RGEXOx96-1
外泌体捕获和分离试剂盒 (磁珠抗体捕获)	EXOMCUxx-10/ EXOMSPxx-10/
外泌体纯化色谱柱	EXOSEC0.5-5/ EXOSEC1.0-3
外泌体纯化试剂盒	EXOSECCon0.5-5/ EXOSECCon1.0-3/ EXOSECCon3.0-2

简略操作方法



技术支持

关于查看详细产品信息和下载相关资料请登陆：<http://www.rengenbio.com>

同时可通过电话或 Email 接触技术支持。

公司：**辽宁润基生物科技有限公司**

地址：辽宁省沈阳市经济技术开发区十三号路 77 号联东 U 谷 20 号楼

邮编：110027

电话：024-31086590

传真：024-31086589

邮箱：公司信息 info@rengenbio.com

技术支持 support@rengenbio.com

产品订购 order@rengenbio.com



微信公众号



外泌体研究交流群