



产品使用说明书

外泌体表面修饰试剂盒（蛋白靶向）

Exsomes Decorating Kit (for targeting protein)

Cat.# **ExoSMpro05-1**
 ExoSMpro10-1

辽宁润基生物科技有限公司

Liaoning Rengen Biosciences Co.,Ltd.

Version 1.0

19/6/2020

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	5
实验数据分析	8
相关产品息	10
技术支持	12

保存与应用

【保存条件】

干冰或冰袋运输，收到试剂盒后按不同组分分别在 2-8℃或-20℃下保存。有效期 6 个月，使用前请仔细阅读说明书。

【应用范围】

本产品只用于科学研究，不能用于临床诊断和治疗。

产品介绍

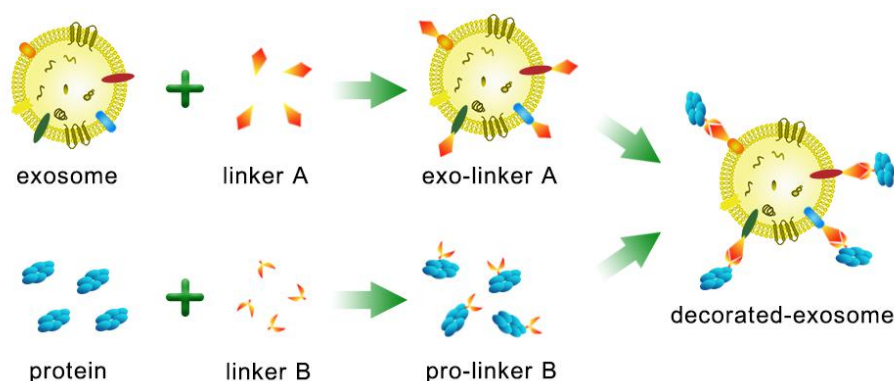
外泌体(Exosome)是由不同细胞分泌的直径 30-150nm 的胞外膜性囊泡。外泌体内容物丰富,包括蛋白质、脂质和核酸等,在细胞间信息交流中发挥着重要作用,并与多种疾病的发生、发展、治疗及预后密切相关。

作为天然的胞间信息载体,外泌体免疫原性低,生物相容性高,在人体血液中比较稳定。能够利用增强渗透滞留效应(Enhanced Permeation and Retention effect, EPR),有选择性的渗透和滞留在肿瘤或炎症组织部位,可穿透血脑屏障等。不仅可以通过其内源内容物直接对受体细胞进行治疗,也可以作为药物载体,递送化学药物、蛋白质、多肽及基因药物,在医疗领域具有巨大的应用潜力。

为了增强外泌体的治疗效果,降低对正常细胞的毒害,需提高外泌体的靶向递送能力,目前科研常用方法是基因改造分泌外泌体的细胞,利用重组克隆质粒,在细胞中表达靶向蛋白或多肽-外泌体膜蛋白复合体,收集释放的外泌体,来获得靶向外泌体,但该方法修饰效率低,且部分细胞转染困难,难以大规模制备。

本试剂盒避开繁琐的基因克隆步骤,通过点击化学反应,直接在提取的外泌体表面修饰目标蛋白。首先将点击化学 linker A 分子共价偶联在外泌体表面,形成 exo-linker A,点击化学 linker B 分子与靶向蛋白共价偶联,形成 pro-linker B,各自纯化,去除剩余的 linker 分子。然后将 exo-linker A 和 pro-linker B 孵育,两个 linker 之间发生快速高效的点击化学反应,以共价键形式将目标蛋白偶联在外泌体表面,最后采用 SEC 分子排阻柱将剩余的 pro-linker B 去除,得到大量纯净的修饰外泌体。

本试剂盒表面修饰效率高,反应条件温和,生理条件下即可发生反应,反应特异性好,无有害副产物,不需额外添加催化剂或其他化学物质,不会损伤外泌体膜结构,也不影响目标蛋白的生物活性和功能,为靶向外泌体提供了一种高效、简便的修饰手段,可实现靶向外泌体的大规模制备。



试剂盒组成和说明

组分	Cat.#	Cat.#	保存温度
	ExoSMpro05-1	ExoSMpro10-1	
点击化学 linker A 干粉	1 支	1 支 x 2	-20°C避光、干燥
点击化学 linker B 干粉	1 支	1 支 x 2	-20°C避光、干燥
反应增强液	100 μ L \times 1 支	200 μ L \times 1 支	2-8°C
SuperEV 0.5 外泌体纯化柱 (Cat.# EXOSEC0.5-5)	10mL \times 5 支	10mL \times 10 支	2-8°C
蛋白纯化柱	2mL \times 5 支	2mL \times 10 支	2-8°C

注意：两种纯化柱内均含有保存液，请竖立保存。

需自备的试剂和设备

1. 二甲基亚砜 (DMSO)
2. PBS 缓冲液 (pH 7.2-7.6)
3. 目标蛋白 (不低于 0.2mg/mL)
4. 0.22 μ m 滤膜
5. 收集管 (烧杯, 2mL 和 mL 离心管)
6. 旋转混匀仪或震荡混匀仪
7. 恒温培养箱 (37°C)

【注意事项】

1. 点击化学 linker A 和 linker B 易水解，使用前需室温放置 10 分钟，平衡至室温，避免冷凝水凝结，使用后请立即盖好旋紧，用封口膜密封。
2. 外泌体和蛋白缓冲液中避免含有 Tris、甘氨酸等含有胺的物质。
3. 可以对任何来源的外泌体进行修饰，包括细胞培养液和体液(如，血清、血浆、尿液、CSF 或唾液等) 提取的外泌体。
4. 不建议使用 PEG 沉淀法提取的外泌体，推荐使用超速离心法、亲和色谱法、SEC 分子排阻色谱法或磁珠捕获等方法提取的外泌体。
5. 为达到较好的体内浓度和靶向效果，外泌体浓度不得低于 5×10^{10} 颗粒数/mL。

6. 目标蛋白浓度请勿低于 0.2mg/mL，外泌体修饰效率会随着蛋白浓度的减少而降低。
7. 本试剂盒为非无菌操作，在进行下游细胞实验或体内实验前，必须将修饰好的外泌体进行 0.22um 滤膜过滤，以达到无菌状态。
8. 本试剂盒未开封前的有效期为 6 个月，请在有效期内使用。

操作方法

一、实验前准备

1. 冻干粉 linker A 和 linker B 溶解

将 linker A 和 linker B 置于室温中放置至少 10 分钟，充分平衡至室温。打开封口膜，在每个管中加入 60μL 二甲基亚砜（DMSO），上下吹打使其充分混匀，制备成 5mM 的 linker A 和 linker B，盖好旋紧，等候下步使用。

2. 计算 5mM linker B 加入靶蛋白溶液中的量

每个反应中 linker B 的使用量，取决于目标蛋白的使用浓度。通常，linker B 和目标蛋白的摩尔比为 5:1 时，能达到较理想的效果。

以浓度 1mg/mL 靶蛋白（分子量 Mr）为例，200μL 中加入 5mM linker B 的计算方法：

1) 计算 1mg/mL 靶蛋白（分子量 Mr）的摩尔浓度(mM)：

$$\frac{1\text{mg/mL}}{\text{Mr}} \times 1000 = \text{___ mM}$$

2) 1mg/mL 靶蛋白，200μL，应加入 5mM 的 linker B 溶液体积：

$$\text{___ mM} \times \frac{5}{1} \times 200\mu\text{L} \times \frac{1}{5\text{mM}} = \text{___ } \mu\text{L}$$

计算示例：

1mg/mL 的 IgG（分子量 150KDa）溶液，200μL 中需加入 5mM linker B 的量为 1.33μL。

$$1) \frac{1\text{mg/mL}}{150,000} \times 1000 = 0.00667\text{mM}$$

$$2) 0.00667\text{mM} \times \frac{5}{1} \times 200\mu\text{L} \times \frac{1}{5\text{mM}} = 1.33\mu\text{L}$$

3. SuperEV 0.5 外泌体纯化柱和蛋白纯化柱室温平衡

从冰箱中取出 SuperEV 0.5 外泌体纯化柱和蛋白纯化柱，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：HCS1012），室温放置至少 30 分钟，使柱子充分平衡至室温。

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。

二、外泌体偶联 linker A，靶向蛋白偶联 linker B

1. 外泌体偶联 linker A

取 600 μ L 外泌体至 2mL 离心管中，加入 2.4 μ L 反应增强液，吹打混匀，再加入 9.6 μ L 5mM 的 linker A，吹打混匀，置于旋转混匀仪或震荡混匀器上，室温震荡孵育 1.5 小时，即得到 exo-linker A 反应物。

组分	加入体积 (μ L)	过程
外泌体	600	室温孵育 1.5 小时
反应增强液	2.4	
点击化学 linker A (5mM)	9.6	

2. 蛋白偶联 linker B

根据靶向蛋白浓度，计算 5mM linker B 的加入量，使 linker B 与蛋白的分子摩尔比为 5:1。取 200 μ L 靶向蛋白（缓冲液最好为 PBS）至 2mL 离心管中，再加入 linker B，吹打混匀，置于旋转混匀仪或震荡混匀器上，室温震荡孵育 1.5 小时，得到 pro-linker B 反应物。

组分	加入体积 (μ L)	过程
靶向蛋白	200	室温孵育 1.5 小时
点击化学 linker B (5mM)	根据计算量加入	

三、exo-linker A 和 pro-linker B 的纯化

1. 纯化柱平衡（可在外泌体或靶向蛋白孵育 linker 时完成）

- 1) 将收集管（烧杯或普通离心管）放置在 SuperEV 0.5 外泌体纯化柱和蛋白纯化柱下方，打开顶盖，用移液器吸弃上方的保存液。
- 2) 外泌体纯化柱取下底盖，分次共加入 20mL PBS 冲洗柱子。
- 3) 蛋白纯化柱取下底盖，分次共加入 4mL PBS 冲洗柱子。
- 4) 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. **exo-linker A** 纯化（去除游离的 **linker A** 分子）

- 1) 使用冲洗后的 SuperEV 0.5 纯化柱进行纯化，吸弃纯化柱筛板上方的 PBS，取下柱子底盖，下方放置 5mL 离心管。
- 2) 将 **exo-linker A** 反应物混匀，瞬时离心，使液体全部集中在管底。
- 3) 在筛板上方加入全部的 **exo-linker A** 反应物（约 600 μ L），待样品全部进入筛板，出口无液体流出时，加入 2.9mL PBS，当液体全部流出后，收集完毕。该馏分大约 3.5mL，不含外泌体，可直接丢弃。
- 4) 继续加入 1.2mL PBS 洗脱，用 2mL 离心管收集馏分。待出口无液体流出时，该馏分收集完毕。**exo-linker A** 集中在该馏分，可用于下步操作。
- 5) 收集完毕后，用 20mL PBS 对柱体进行冲洗，冲洗后的柱子加入少量 PBS，盖上底盖，等待后续操作。

3. **pro-linker B** 纯化（去除游离的 **linker B** 分子）

- 1) 使用冲洗后的蛋白纯化柱进行纯化，吸弃纯化柱筛板上方的 PBS，取下柱子底盖，下方放置 2mL 离心管。
- 2) 将 **pro-linker B** 反应物混匀，瞬时离心，使液体全部集中在管底。
- 3) 在筛板上方加入全部的 **pro-linker B** 反应物（约 200 μ L），待样品全部进入筛板，出口无液体流出时，加入 550 μ L PBS。当液体全部流出后，收集完毕，该馏分大约 750 μ L，不含蛋白，可直接丢弃。
- 4) 继续加入 300 μ L PBS 进行洗脱，用 2mL 离心管收集馏分。待出口无液体流出时，该馏分收集完毕。**pro-linker B** 集中在该馏分，可用于下步操作。
- 5) 收集完毕后，柱子可直接丢弃。

四、**exo-linker A** 和 **pro-linker B** 点击化学反应及纯化

1. **exo-linker A** 与 **pro-linker B** 点击化学反应

将 300 μ L 纯化 **pro-linker B** 加入到 1200 μ L 纯化 **exo-linker A** 中，吹打混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

组分	加入体积 (μL)	过程
纯化的 exo-linker A	1200	37°C 孵育 30 分钟
纯化的 pro-linker B	300	

2. 纯化（去除未结合的 pro-linker B）

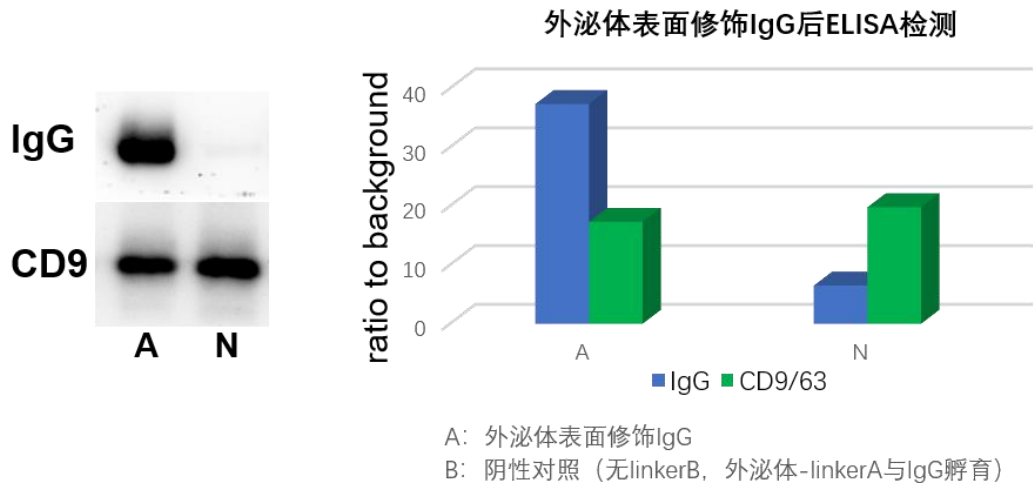
- 1) 使用上面冲洗后的 SuperEV 0.5 外泌体纯化柱进行纯化，步骤同前。
- 2) 吸弃纯化柱筛板上方的 PBS，取下柱子底盖，下方放置 5mL 离心管。
- 3) 将点击化学反应混合物混匀，瞬时离心，使液体全部集中在管底；
- 4) 在筛板上方加入 750μL 的点击化学反应混合物，待样品全部进入筛板，出口无液体流出时，加入 2750μL PBS。液体全部流出后，收集完毕。该馏分大约 3.5mL，不含外泌体，可直接丢弃；
- 5) 继续加入 1500μL PBS 进行洗脱，用 5mL 离心管收集馏分。待出口无液体流出时，该馏分收集完毕。**修饰的靶向外泌体收集在该馏分；**
- 6) 收集完毕后，用 20mL PBS 对柱体进行冲洗；
- 7) 冲洗完毕后，继续将剩余的 750μL 的点击化学反应混合物加入纯化柱中，进行纯化，步骤同 4) 和 5)。
- 8) 收集完毕后，柱子可直接丢弃。
- 9) 本试剂盒操作过程不是无菌操作，在进行下游细胞实验或体内实验前，必须将修饰的外泌体进行 0.22um 滤膜过滤，以保证无菌。

实验数据分析

1. ELISA 和 Western Blot 证实外泌体表面成功修饰了目标蛋白

按本试剂盒操作方法，将 1mg/mL 的 IgG (分子量 150kDa)，修饰在已纯化的尿外泌体表面 (A)，阴性对照 (N) 中 IgG 只是不偶联 linker B，其余操作与 A 相同。

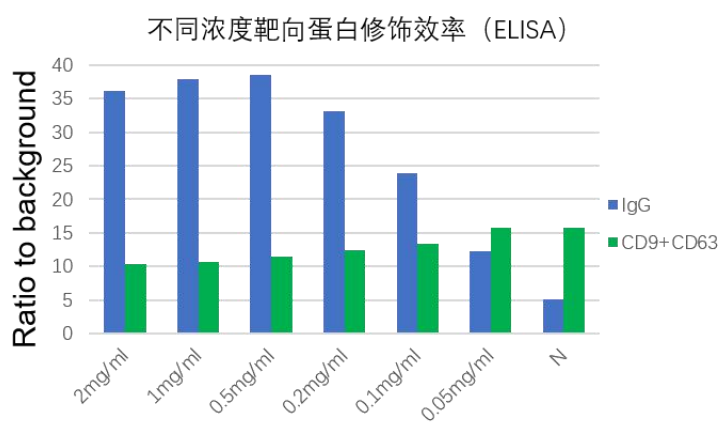
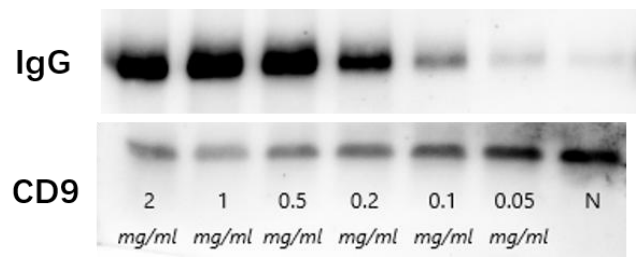
Western Blot 和 ELISA (双抗体夹心法，CD9/CD63 捕获外泌体后再检测 IgG 或 CD9/63)，从下图中可说明，采用本试剂盒可成功将 IgG 蛋白修饰在外泌体表面。



2. 不同浓度蛋白表面修饰效率

按本试剂盒操作方法，使用不同浓度的 IgG（分别为 2mg/mL、1mg/mL、0.5mg/mL、0.2mg/mL、0.1mg/mL、0.05mg/mL）对纯化的尿外泌体表面进行修饰，阴性对照（N）的 IgG 使用浓度为 0.5mg/mL，只是不偶联 linker B，其余操作一致。

Western Blot 和 ELISA 检测结果显示，修饰效率与靶向蛋白使用浓度在一定范围内呈正相关，修饰效率随 IgG 浓度增加而提高，当浓度为 0.5mg/mL 时，修饰效率达到最佳。



相关产品信息

相关产品	目录号
外泌体浓缩试剂盒（细胞培养上清或尿液）	EXOCon10-10/ EXOCon40-10
外泌体纯化试剂盒(SuperEV 柱+浓缩柱)	EXOSECon0.5-5/ EXOSECon1.0-3/ EXOSECon3.0-2
人外泌体捕获和分离试剂盒(CD9/63/81 捕获磁珠) (细胞上清或尿液)	EXOMCUCom-10
外泌体表面修饰试剂盒（SA-Biotin）	ExoSMSA05-1/ ExoSMSA10-1
蛋白质生物素标记和纯化试剂盒	Probio10-1/ Probio20-1
外泌体表面修饰试剂盒（叶酸）	ExoSMfol05-1/ ExoSMfol10-1/
外泌体生物素标记和纯化试剂盒	ExoPbio05-1/ ExoPbio10-1
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

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

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