

产品使用说明书

外泌体纯化试剂盒-**SuperEV3.0**

Exosome Purification Kit -SuperEV3.0

Cat.# EXOSECon3.0-2

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	3
操作方法	4
第一部分 通过超纯色谱柱实现 EVs 的分离.....	4
第二部分 通过 EVs 浓缩柱实现馏分的浓缩和纯化.....	6
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°C 运输，收到试剂盒后，SuperEV3.0 超纯色谱柱需**直立**放置，2-8°C 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. 本试剂盒包括超纯色谱柱（SuperEV0.5）和 EVs 浓缩柱，首先通过超纯色谱柱基于尺寸排阻色谱原理，实现血浆/血清或浓缩的样本中 EVs 与蛋白质的分离，然后通过 EVs 浓缩柱基于凝胶树脂层析实现馏分的浓缩和进一步纯化。
2. 纯化的 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 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。针对获得的馏分再通过 EVs 浓缩柱，基于凝胶树脂层析实现馏分的浓缩和进一步纯化。此种组合得到的 EVs 不仅纯度更高，优于超速离心，而且保持 EVs 的生物学功能，适合 EVs 蛋白质质谱分析，RNA 高通量测序和 EVs 的体内外细胞实验等。另外，还可用于大量制备适合于临床应用的 EVs 产品。

试剂盒组成和说明

包装	组分名称	数量	保存温度
A	SuperEV3.0 超纯色谱柱	2 支	2-8°C
B	结合树脂 (Binding Resin)	6 mL	2-8°C
	纯化柱 (Spin Columns)/收集管 (Collection Tubes 15mL)	10 套	RT
	结合缓冲液 (Binding Buffer)	10 mL	2-8°C
	洗脱缓冲液 (Elution Buffer)	6 mL	2-8°C
	15mL 离心管 (Centrifuge Tubes 15mL)	10 个	RT

需自备试剂

- PBS 缓冲液，经 0.22 μ m 滤膜过滤
- 纯水，经 0.22 μ m 滤膜过滤
- 0.45-0.80 μ m 针头过滤器

- 20%乙醇水溶液
- 收集管（烧杯，普通离心管等）

主要特点

- 耗时短，大约需要 1 个小时。
- 操作简便，无需特殊设备，如超速离心机。
- 重复性好，超纯色谱柱可重复使用 5 次，EVs 浓缩柱为一次性使用。
- 操作温和，最大程度保持 EVs 完整形态结构和生物学功能。
- 回收率高，达到 70-85%。
- 浓度高，能浓缩 25-50 倍。
- 纯度高，总蛋白去除约 99.9%，脂颗粒去除约 90%。

操作方法

第一部分 通过超纯色谱柱实现 EVs 的分离

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°C），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 0.22μm 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 0.22μm 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×g 离心 20 分钟，取上清● 0.45-0.80μm 滤膜过滤，待用。
浓缩的细胞培养上清或尿液	<ul style="list-style-type: none">● 对于冻存的细胞培养上清或尿液样本，室温或 25°C 水浴解冻，将完全融化的样品置于冰上；对于新鲜的细胞培养上清或尿液样本，置于冰上，3,000×g，4°C 离心 10min，去除细胞或细胞碎片，离心后将上清转移至新管中。● 浓缩含外泌体样本，可采用超滤管，超速离心，聚合物沉淀或润基生物的外泌体浓缩试剂盒（EXOCon10-10/EXOCon40-10）等。

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，用大于 2.0mL 离心管收集馏分。每次加入 2.0mL 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 2.0mL 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 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°C 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。

第二部分 通过 EVs 浓缩柱实现馏分的浓缩和纯化

1. 外泌体结合

取上述馏分大约 8.0mL 加入离心管中（试剂盒不提供），加入 1/10 体积的结合缓冲液（如 0.80mL），盖紧盖子，颠倒混匀。

2. EVs 浓缩和纯化

吸取 600 μ l 结合树脂（吸取前彻底混匀结合树脂，快速吸取）加入步骤 1 中的离心管中，盖紧盖子，室温颠倒混匀 15min 后，1,500 \times g 室温离心 3min。将离心管从离心机中取出，用移液器取 1.0ml 上清液（不要弃掉），小心倒掉剩余上清液，用移液器中的液体（1.0ml）轻轻吹起树脂，全部转移至纯化柱中（已放入收集管），静置 2min，3,000g 室温离心 2min，弃去滤液及收集管，将纯化柱放入 15ml 离心管中。

3. EVs 洗脱

向纯化柱中加入 600 μ L 洗脱液，静置 5min，500 \times g 室温离心 2min，将滤液

重新加入到纯化柱中，静置 2min，500×g 室温离心 2min，最后 3,000×g 室温离心 2min，所得滤液即为浓缩的 EVs。

提取的 EVs 可直接应用于下游实验，或者 2-8°C 保存一周，-20°C 或 -80°C 保存大约三个月。

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 A 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。

从图 1 B 看出，当上样体积增加时，EVs 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。

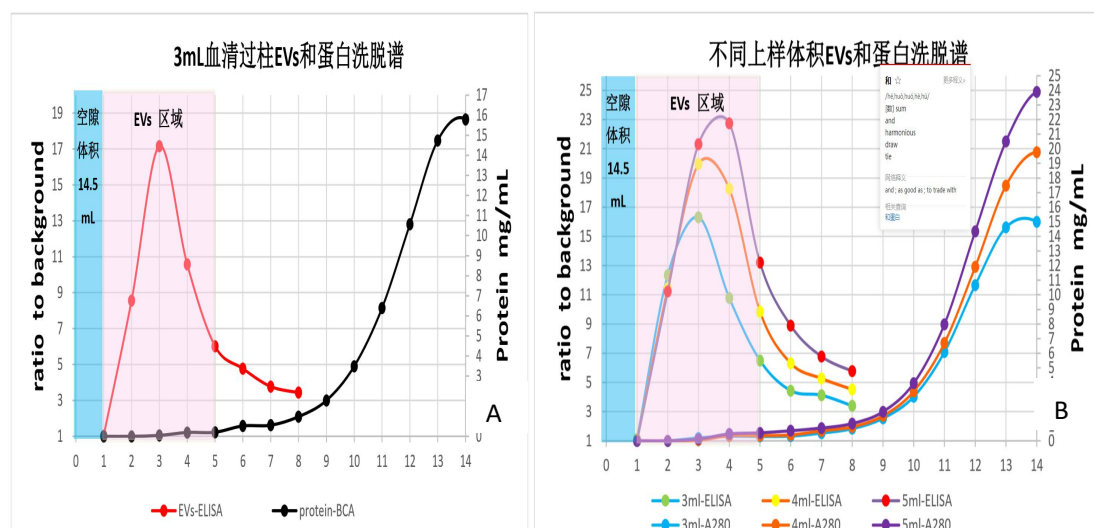


图 1 (A) 3.0mL 血清过 SuperEV3.0 柱的 EVs 和蛋白洗脱谱；(B) 不同体积血清上样 (3.0mL, 4.0mL, 5.0mL) 过 SuperEV3.0 柱时 EVs 和蛋白洗脱谱。

2. 回收率和纯度分析

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。从图 2 A 看出，收集馏分 2 和 3，回收率为 **43.8%**；收集馏分 2-4，回收率为 **71.2%**；收集馏分 2-5，回收率可达到 **82.4%**。收集的馏分数目越多，回收率越高，稀释度越大，EVs 纯度也会相应降低。

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，从图 2 B 看出，SuperEV0.5 柱分离的 EVs 纯度明显高于沉淀法和超速离心法。

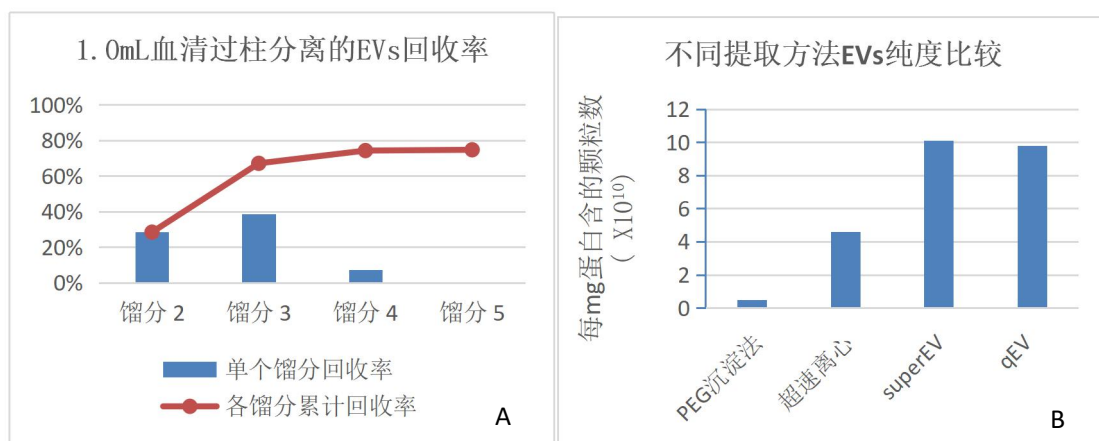
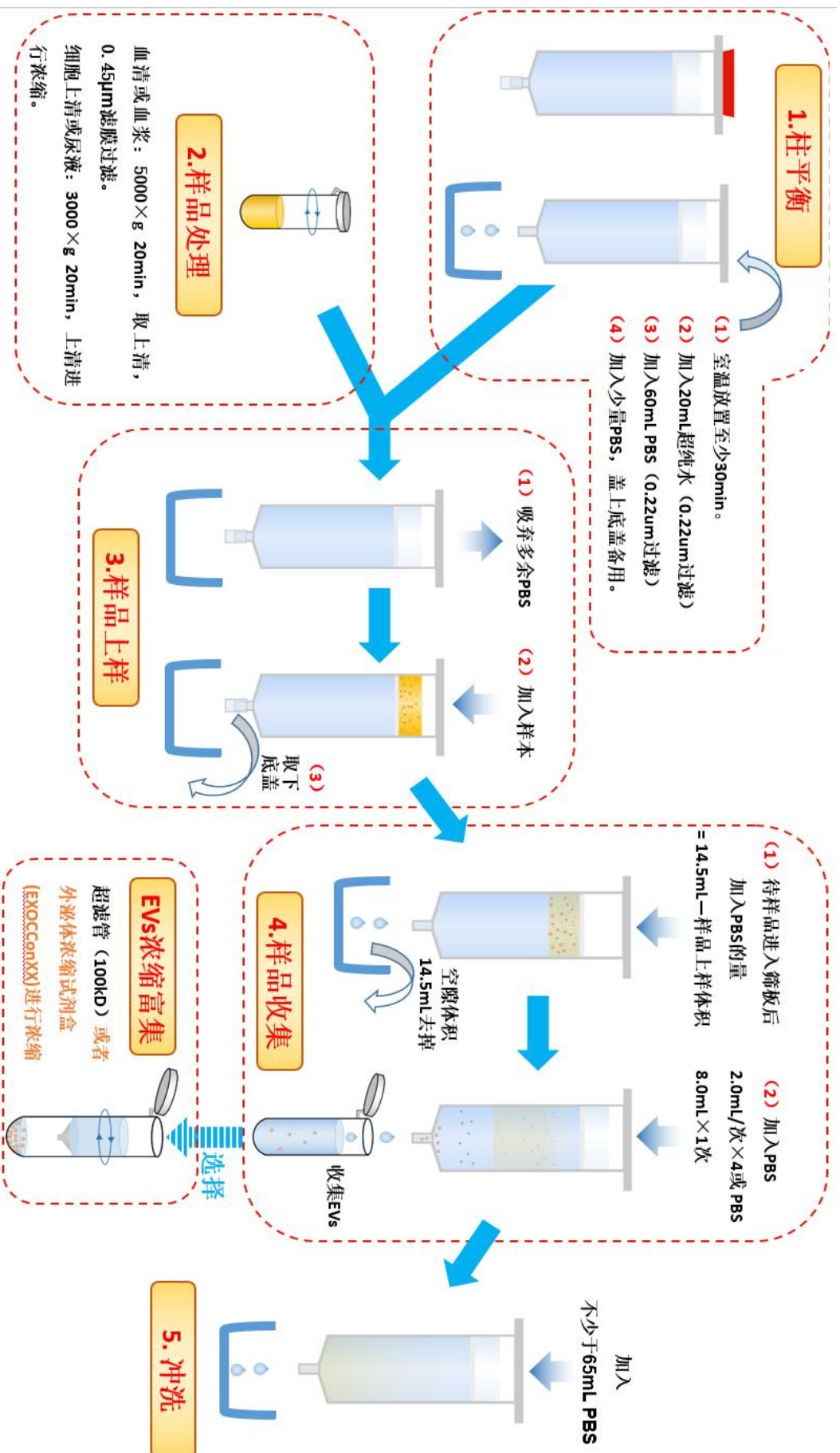


图 2 (A) 1.0mL 血清过 SuperEV 1.0 柱的 EVs 回收率；(B) 不同提取方法 EVs 纯度比较。

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)	EXOCon10-10/ EXOCon40-10
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/
SuperEV™ 超纯尺寸排阻色谱柱	EXOSEC0.5-5/ EXOSEC1.0-3/ EXOSEC3.0-2
外泌体纯化试剂盒	EXOSECCon0.5/ EXOSECCon1.0 / EXOSECCon3.0

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