

血清/血浆外泌体快速纯化试剂盒

Serum/Plasma Exosome Rapid Purification Kit

产品编号	试剂名称	规格	保存条件
FRE-02	Buffer EXA (纯化试剂)	100 mL	4 °C
	Buffer EXE (洗脱液)	20 ml	4 °C
	Buffer EXH (去蛋白液)	12 ml	4 °C
	Magnetic Beads (磁珠)	5 ml	4 °C
	针式过滤器 C ($\phi 25$ mm, 0.2 μ m)	10 个	4 °C或 RT
	纯化柱型过滤器 (中柱)	10 套	4 °C或 RT
	说明书	1 份	

一、运输与存储条件。

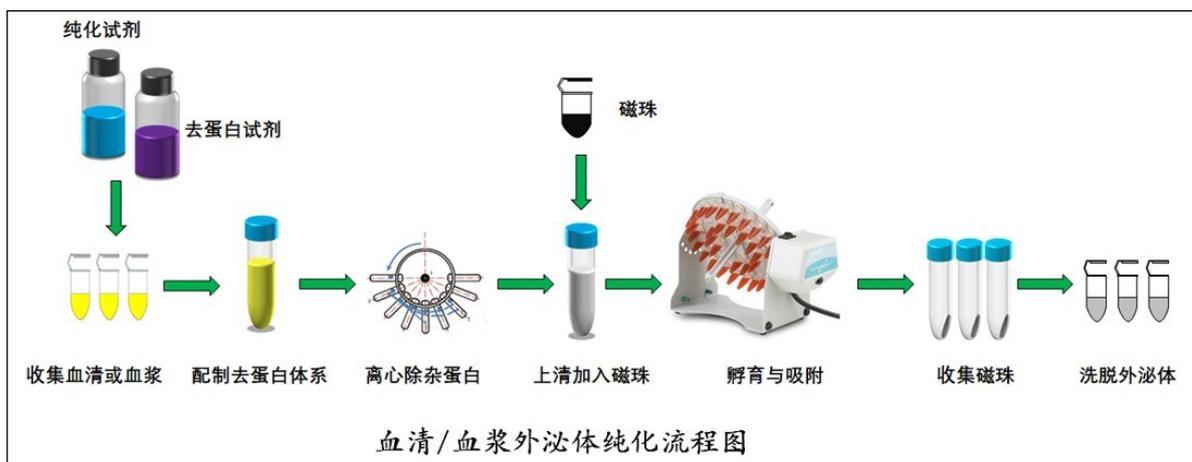
本产品低温（冰袋）运输，4 °C保存，有效期1年。

二、注意事项（使用前阅读）。

1. 磁珠 4 °C存放，严禁冻存，否则失效。
2. Buffer EXA 存放于 4 °C冰箱，严禁室温长时间放置。
3. 实验过程中所用的 PBS 和 ddH₂O 必须使用滤膜孔径为 0.2 μ m 的滤器过滤。
4. 本试剂盒仅用于提取血清和血浆中的外泌体，且可根据样品体积来调节纯化体系。
5. 新鲜制备的血清或血浆样品，或-80 °C冻存的样品，外泌体提取效果较好。反复冻融，或保存期限较长的血清或血浆样品，提取的外泌体浓度会降低。
6. 反复冻融会导致外泌体破裂，影响电镜检测结果，请使用新鲜提取的外泌体，或 4 °C 保存的外泌体进行透射电镜检测，。
7. 为了您的健康，实验过程中请穿好实验服、佩戴乳胶手套和安全眼镜。

三、产品简介。

本试剂盒专门用于提取血清/血浆样品中的外泌体，试剂盒中的 Buffer EXH 可以有效清除血清或血浆中的杂蛋白（包括白蛋白、球蛋白和脂蛋白），提高外泌体的纯度。试剂盒的核心成份是自主研发的磁珠，表面修饰特定的化合物，能够在外泌体纯化体系中改变构象，有效捕捉样品中的外泌体。利用磁力架或离心机沉淀磁珠后，去除外泌体纯化体系，即可将磁珠表面结合的外泌体洗脱下来，得到高纯度的外泌体。



四、特点与优势。

1. Buffer EXH（去蛋白液）能够去除血清或血浆样品中的白蛋白、球蛋白及其他杂蛋白，有效提高外泌体的纯度。
2. 血清或血浆样品不用稀释等繁琐的预处理，可以直接用于外泌体提取。
3. 可以根据样品体积，配制不同的外泌体纯化体系，适用于不同体积样品中的外泌体提取。
4. 本产品提取的外泌体浓度高，能够达到 10^{11} particles/ml。
5. 本产品提取外泌体过程中不依赖大型实验仪器，操作简单，可以快速（2 h）提取外泌体。

五、自备试剂与耗材。

去离子水（ddH₂O）、50 ml 离心管、5 ml 注射器、磁力架、旋转混合仪、震荡混合仪（Vortex）、冷冻离心机。

六、使用说明。

本产品纯化血清或血浆的体系如下：

血清或血浆	1 ml	0.5 ml	0.3 ml
Buffer EXA	10 ml	5 ml	3 ml
Buffer EXH	1 ml	0.5 ml	0.3 ml
ddH ₂ O	8 ml	4 ml	2.4 ml
Magnetic Beads	0.5 ml	0.25 ml	0.15 ml
合计	20.5 ml	10.25 ml	6.15 ml

本体系为最佳实验系统，可以根据血清或血浆样品的实际体积，缩小或扩大实验体系，但必须保持样品和各种试剂的准确比例，以免实验失败。

1. 样品准备（选做）。若血清或血浆样品比较浑浊，则需离心去除杂质，流程如下：吸取 1 ml 样品，转入 1.5 ml 离心管，12 000 - 16 000 rpm，4 °C 离心 10 min，弃沉淀，上清转移至新的 1.5 ml EP 管中，备用。**注意：若血清或血浆已经离心处理，清澈透明，没有杂质，请忽略此步骤。**
2. 外泌体纯化体系配制。按照上表，在 50 ml 离心管中依次加入 8 ml ddH₂O（**切不可使用 PBS 或其他试剂代替 ddH₂O，否则实验失败**），10 ml Buffer EXA，1 ml Buffer EXH，以及 1 ml 血清或血浆样品，颠倒混匀 20 次。**混匀后溶液变浑浊。若不变浑浊，则蛋白去除效果降低。**
3. 离心去除蛋白。将装有上述混合溶液的离心管转入冷冻离心机，10 000 rpm（**约 11 000 ×g**），4 °C，离心 10 min（**不可低于 10 min，否则沉淀不完全**），弃蛋白沉淀，上清转入新的 50 ml 离心管。
4. 加入 0.5 ml 磁珠（**磁珠使用前，先 Vortex 混匀，使磁珠分散，否则导致磁珠移取不均匀**），转入旋转混合仪，4 °C 旋转混合 90 min。

注意：旋转混合仪中速旋转，不可太快。

若需提高外泌体产量，建议旋转混匀 90 min。

若需提高外泌体纯度，可以旋转混匀 60 min，或 75 min，但外泌体产量会相应减少。

5. 将离心管插入磁力架，4 °C，静置 5 min，使磁珠聚集，并吸除上清液体。**如果没有磁力架，可以用离心的方法来沉淀磁珠，具体流程是：将离心管转入冷冻离心机，4 °C，5000 rpm（约 2800 ×g），离心 3 min，沉淀磁珠，并吸除上清。**
6. 将离心管转入冷冻离心机，4 °C，3 000 rpm（**约 980 ×g**），离心 1 min，转移离心管至磁力架中，吸除残液，去除残液对外泌体的影响，提高外泌体纯度。

注意：离心力不可过大，以免磁珠过度集结，不利于后期的洗脱与分散。

7. 外泌体洗脱。在吸除残液的离心管中加入 1.0 ml Buffer EXE，利用移液器吹打混匀 10 次以上，或利用振荡器剧烈振荡（Vortex）10-30 sec，分散磁珠，洗脱磁珠表面吸附的外泌体。
注意：外泌体洗脱液的体积可以根据纯化系统的体积按比例改变，如 0.5 ml 血清或血浆样品配制的 10.25 ml 纯化系统，其洗脱液的体积可以缩小为 0.5 ml。
8. 转入磁力架，4 °C，静置 2 min，使磁珠聚集。**注：如果没有磁力架，可以省略此步骤。**
9. 转入离心机，10 000 rpm（约 11 000 ×g），4 °C 离心 3 min。将离心管转入磁力架中（**防止磁珠散落在溶液中**），上清转移至新的 EP 管中，即为**纯化的外泌体溶液**。
注意：高速离心可使磁珠聚集，并沉淀杂质，提高外泌体纯度。如果离心机转速无法达到 10 000 rpm，可以用最大转速（如 4 000 rpm）离心 5 min，达到沉淀磁珠的目的即可。
10. 利用试剂盒中的纯化柱型过滤器来清除外泌体溶液中的杂质，因纯化柱型过滤器用的是 15 ml 离心管，请将离心机转子更换成 15 ml 离心管适用的转子。
11. 将纯化柱型过滤器的滤芯装入 15 ml 试管，组装成过滤器。吸取 1 ml 的 Buffer EXE，加入纯化柱型过滤器，转入离心机，8000 rpm（约 7 100 g），4 °C 离心 1 min。取出纯化柱型过滤器，并取出滤芯，用移液器吸除离心管中的滤液，完成滤器清洗。
注：如果离心机的离心力达不到要求，可以降低转速，但需要增加离心时间，如 5 000 rpm，离心 3 min，也可达到类似效果。
12. 将滤芯重新装回 15 ml 离心管，并将洗脱的外泌体溶液加入滤芯，转入离心机，8000 rpm（约 7 100 g），4 °C 离心 1 min。
13. 取出纯化柱型过滤器，离心管中的滤液即为过滤后的外泌体溶液，可立即用于后续实验，或保存于 -80 °C 冰箱。
14. 无菌过滤。若洗脱的外泌体溶液需要做无菌处理，可使用针头滤器过滤，具体流程如下：在超净工作台内，利用试剂盒提供的膜孔径为 0.22 μm 的针头滤器（针式过滤器 C）过滤外泌体溶液，去除杂质和细菌，得到纯净的外泌体溶液。

七、纯化外泌体鉴定。

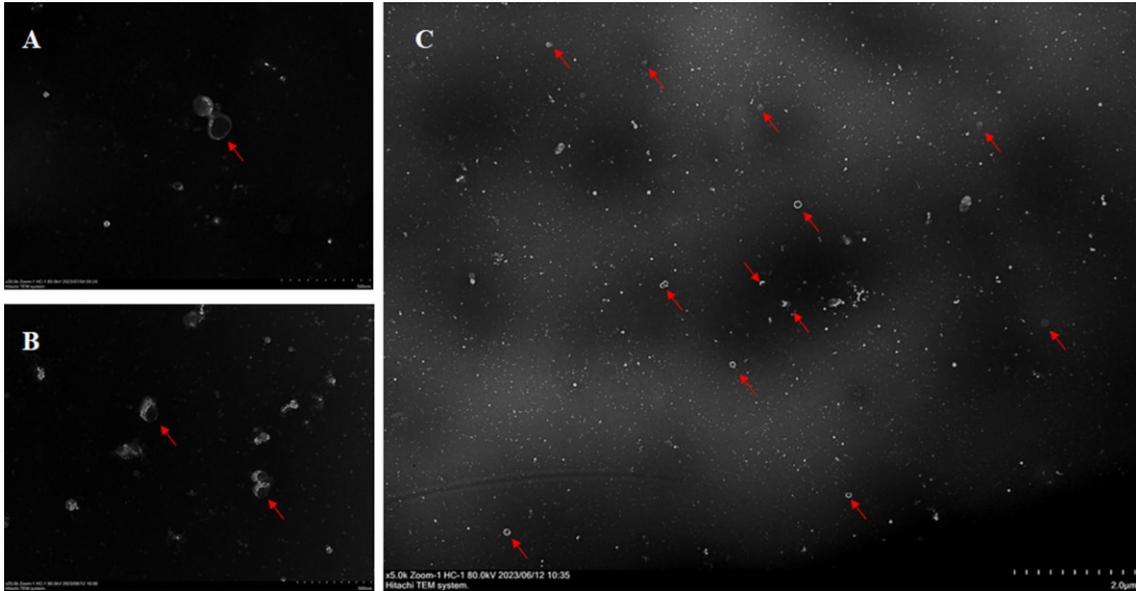


图 1. 血浆外泌体的透射电镜检测

收集血液，并制备血浆，利用本公司的血清/血浆外泌体快速纯化试剂盒（**FRE-02**）提取外泌体，磷钨酸染色，透射电镜检测。结果显示：提取的血浆外泌体，具有典型的杯托状或凹陷的圆盘状形态特征。同时，同一低倍视野内，可以检测到多个外泌体（图 1 C），说明我们的试剂盒纯化的外泌体形态特征明显，数量多。同时电镜背景清晰，说明外泌体的纯度高。

电镜检测流程（扣染法）：

1. 请使用新鲜提取的外泌体溶液，或 4℃ 保存的外泌体溶液（不超过 3 天），用于透射电镜检测。
冻存或反复冻融会导致外泌体破裂，影响电镜检测结果。
2. 利用移液枪吸取新鲜的外泌体溶液，滴一滴在 Parafilm 膜上。
3. 利用尖嘴镊子，取出电镜检测使用的铜网（碳膜铜网），将覆盖碳膜的一面（略显黑色的一面）放置在外泌体液滴上面，呈漂浮状态。室温静置 3-5 min，使外泌体吸附到碳膜上。
4. 吸取磷钨酸溶液（2%，pH=7，由电镜室提供），滴到干净的 Parafilm 膜上。
5. 利用尖嘴镊子，夹取铜网，在滤纸上蘸几下，吸去多余的外泌体液体。并放置在磷钨酸液滴上，带有外泌体样品的一面朝向液滴，呈漂浮状态，室温，静置染色，2-3 min。
6. 用镊子夹取铜网，并用滤纸吸去铜网上多余的磷钨酸染液，置于干净的 parafilm 膜上，备用。
7. 将染好的铜网装入电镜检测装置，透射电镜检测，并拍照。

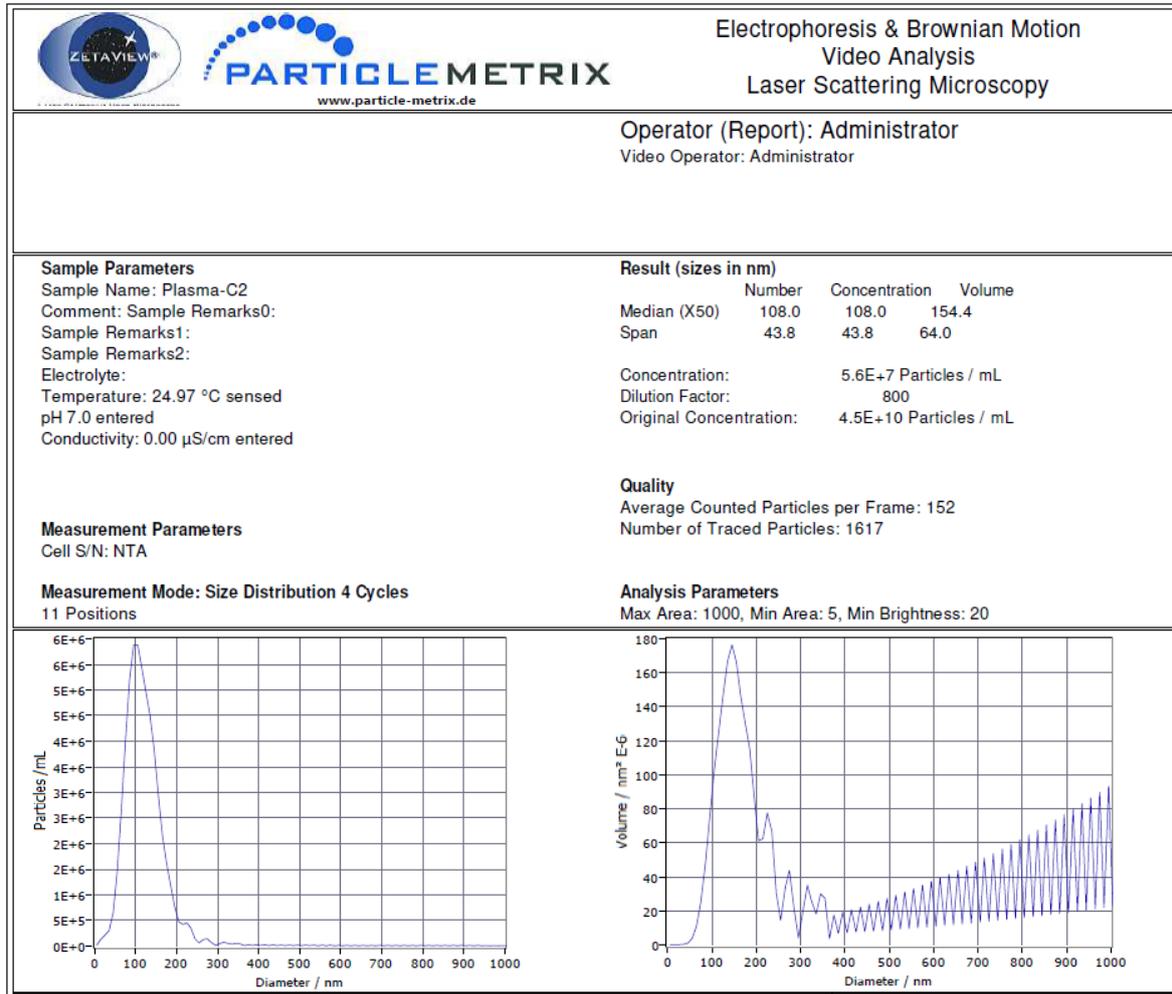


图 2. 血浆外泌体粒径与浓度检测 (NTA)

收集血浆，利用本公司的血清/血浆外泌体快速纯化试剂盒 (FRE-02) 提取血浆中的外泌体，并利用 Zetaview 的仪器检测外泌体的粒径等各项参数。结果表明，提取的血浆外泌体粒径峰值为 108 nm，符合外泌体的大小要求，同时外泌体的原始浓度 4.5×10^{10} particles/ml。

八、常见问题与分析。

问题	可能原因	解决方案
纯化的外泌体浓度低	样品用量较少。	增加样品量。
	样品反复冻融，外泌体破坏。	使用新鲜的样品。
	试剂盒过期。	使用保质期内的试剂。
	磁珠冻存，吸附外泌体能力降低，甚至消失。	更换新的磁珠或试剂盒。
	未按照纯化体系要求，随意更改纯化体系中各试剂比例。	按比例添加试剂盒中的各成分到纯化体系中。
	未按照说明书操作。	孵育方式与洗脱强度等实验操作请严格按照说明书进行。
	磁珠与样品孵育时间偏短。	延长孵育时间。
	洗脱强度偏低。	增加 Vortex 强度，延长 Vortex 时间。
	洗脱液体积偏大	减少洗脱液用量。
提取的外泌体蛋白浓度低	纯化的外泌体浓度较低。	参见上述解决方案。
	外泌体蛋白提取试剂的裂解能力较弱。	使用裂解能力强的蛋白提取试剂，或本公司生产的外泌体蛋白提取试剂盒（FRE-03）。
	本试剂盒纯化的外泌体纯度高，几乎不含杂蛋白。	增加外泌体浓度。
提取的外泌体蛋白中杂蛋白增多	样品与磁珠孵育时间过长，导致杂蛋白非特异性吸附。	减少样品与磁珠的孵育时间。
提取的外泌体 RNA 浓度低	外泌体浓度偏低	参见上述解决方案。
	外泌体用量偏少	增加外泌体用量。
	提取试剂盒不合适。	请选择本公司的外泌体 RNA 提取试剂盒（FRE-04）。

血清/血浆样本制备流程

用于外泌体纯化

1. 采血。利用采血管采取适量的血液。

注意：选择合适的采血管。制备血清，请使用含有凝血激活剂的采血管，而制备血浆则使用不含凝血激活剂的采血管。

2. 血液凝集。将采血管正立于塑料试管架上，4 °C冰箱内存放，等待血液凝集（一般需要数小时）。

3. 离心。3000 rpm（约1 900 g），4 °C，离心10 -15 min。

4. 收集样本。用移液枪转移上层血清或血浆样品（黄色）至新的离心管中。一般情况下，10 ml 血液可分离3-5 ml的血清或血浆。

5. 离心去除杂质。将分离的血清或血浆转入冷冻离心机，16 000 g，4 °C，离心10 min。

6. 转移上清到一个新的1.5 ml 离心管中，立即使用，或-80 °C保存。

采血后，所有操作尽量在低温条件下进行。