

# 外泌体快速纯化试剂盒 (简捷型)

## SimpleExo Purify Kit

产品编号	试剂名称	规格	数量	保存条件
FRE-05	Buffer EXP	50 mL/瓶	1 瓶	4 °C
	Buffer EXN	20 ml/瓶	1 瓶	4 °C
	Buffer EXE	20 ml/瓶	1 瓶	4 °C
	Magnetic Beads (磁珠)	5 ml /瓶	1 瓶	4 °C
	针式过滤器 A (φ25 mm, 5 μm, 红色)	10 个/袋	1 袋	4 °C或 RT
	纯化柱型过滤器	10 个/套	1 套	4 °C或 RT
	说明书		1 份	

### 一、运输与存储条件。

本产品冰袋运输，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. 实验过程中所用的 PBS 和 ddH<sub>2</sub>O 必须使用滤膜孔径为 0.2 μm 的滤器过滤。
3. 利用透射电镜检测外泌体形态时，请尽量使用新鲜提取的外泌体，或 4 °C存放的外泌体。外泌体冻存后易破裂，影响实验效果。
4. 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。

本产品是一款从样品中快速提取外泌体的试剂盒，操作简单，且不需要特殊实验设备，能够从细胞培养上清、细菌培养上清以及其他液体样品中快速提取外泌体，用于后续的形态特征检测。本产品不用于血清，或血浆等蛋白含量较高样品中的外泌体提取。

### 四、特点与优势。

1. 本产品操作简单，可以快速（2 h）提取样品中的外泌体。
2. 本产品提取的外泌体纯度高，杂蛋白含量低。

### 五、实验所需试剂、耗材与仪器。

50 ml 离心管、50 ml 注射器、磁力架（50 ml）、旋转混匀仪、震荡混合仪（Vortex），冷冻离心机。

### 六、使用说明。

本产品提取外泌体的实验体系如下：

培养上清（样品）	24 ml
Buffer EXP	4.5 ml
Buffer EXN	1.5 ml
Magnetic Beads	0.5 ml
<hr/>	
合计	30.5 ml

本体系为最佳实验系统，可以按照各成份比例扩大或缩小实验体系。

1. **样品制备（选做）。**吸取 30 ml 的细胞培养上清，利用试剂盒提供的针头过滤器 A（ $\phi 25$  mm，5  $\mu$ m）过滤，去除杂质。本步骤的主要目的是去除样品中的细胞碎片等杂质。若样品已经通过离心或过滤等步骤除去杂质，可以省略本实验步骤。
2. 吸取 24 ml 去除杂质的细胞培养上清，转入 50 ml 离心管，并依次添加 4.5 ml Buffer EXP，1.5 ml Buffer EXN，及 0.5 ml 磁珠（磁珠使用前，先震荡混匀（Vortex），使磁珠分散，保证均匀移取）。盖紧离心管盖，颠倒混匀。
3. 将装有外泌体纯化系统的 50 ml 离心管转入旋转混合仪，4 °C 旋转混合 60 min（60-90 min）。

**注意：**旋转混合仪旋转速度不可太快，以保证磁珠与样品的充分孵育。

若需提高外泌体产量，旋转孵育时间增加到 90 min，但外泌体纯度会相应降低。

4. 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，3 000 rpm（约 980 ×g），离心 3 min，沉淀磁珠，并吸除上清。
5. 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（防止磁珠分散），吸除残液。

**注意：**本步骤的主要目的是去除残液对外泌体的影响，提高外泌体纯度。

本步实验中离心力不可过大，以免磁珠过渡集结，不利于后期的外泌体洗脱。

6. 外泌体洗脱。在吸除残液的离心管中加入 0.5~1.0 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。
7. 转入磁力架，4 °C，静置 2 min，聚集磁珠。**注：**如果没有磁力架，可以省略此步骤。
8. 转入离心机，10 000 rpm（约 11 000 ×g），4 °C离心 3 min，并转入磁力架上（防止磁珠散落），利用移液枪转移上清至新的 EP 管中，即为外泌体溶液。

**注意：**高速离心使磁珠高度聚集，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。

9. 去除杂质。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。
10. 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。

11. 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。
12. 取出纯化柱型滤器，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。

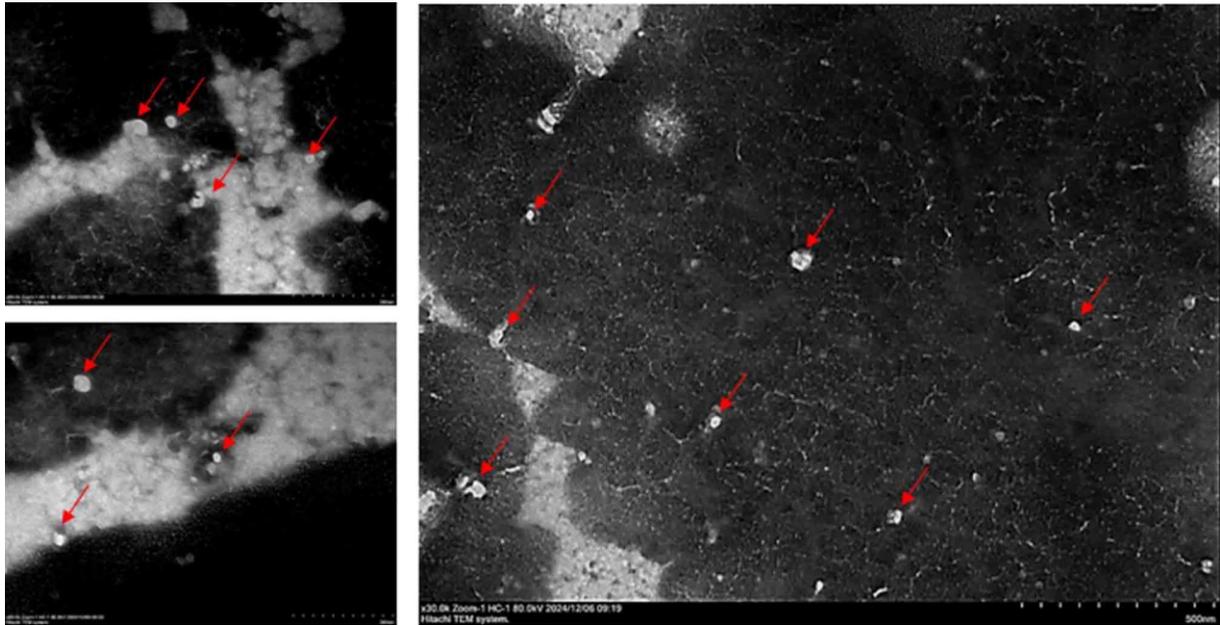


图 1. 人脐带间充质干细胞外泌体的透射电镜检测

收集人间充质干细胞（MSC）培养上清，利用本公司的外泌体快速纯化试剂盒（简捷型，FRE-05）提取外泌体，磷钨酸染色，透射电镜检测。结果显示：本产品提取的 MSC 外泌体，具有典型的杯托形态特征（图 1A 和 B），且同一视野内，可以检测到多个外泌体（图 1C），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，说明外泌体的纯度很高。

#### 电镜检测流程：

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，影响检测结果。
2. 利用尖嘴镊子，取出电镜检测使用的铜网（碳膜铜网），放置在 parafilm 膜上面，将覆盖碳膜的一面（略显黑色的一面）向上。
3. 利用移液枪吸取外泌体溶液，滴一滴在碳膜铜网上，室温静置 3-5 min，铜网碳膜吸附外泌体。
4. 使用滤纸，吸除多余的外泌体溶液，并利用尖嘴镊子，夹取铜网，放置在 Parafilm 膜上，覆盖碳膜的一面朝上，稍微晾干一下。
5. 吸取磷钨酸溶液（2%，pH=7，由电镜室提供），滴一滴到铜网的碳膜上，室温染色 3 min。
6. 用滤纸吸除多余的磷钨酸染液，并利用尖嘴镊子夹取铜网，放置在新的干净的 Parafilm 膜上，覆盖碳膜的一面朝上，晾干。
7. 将染好的铜网装入电镜检测装置，透射电镜检测，并拍照。

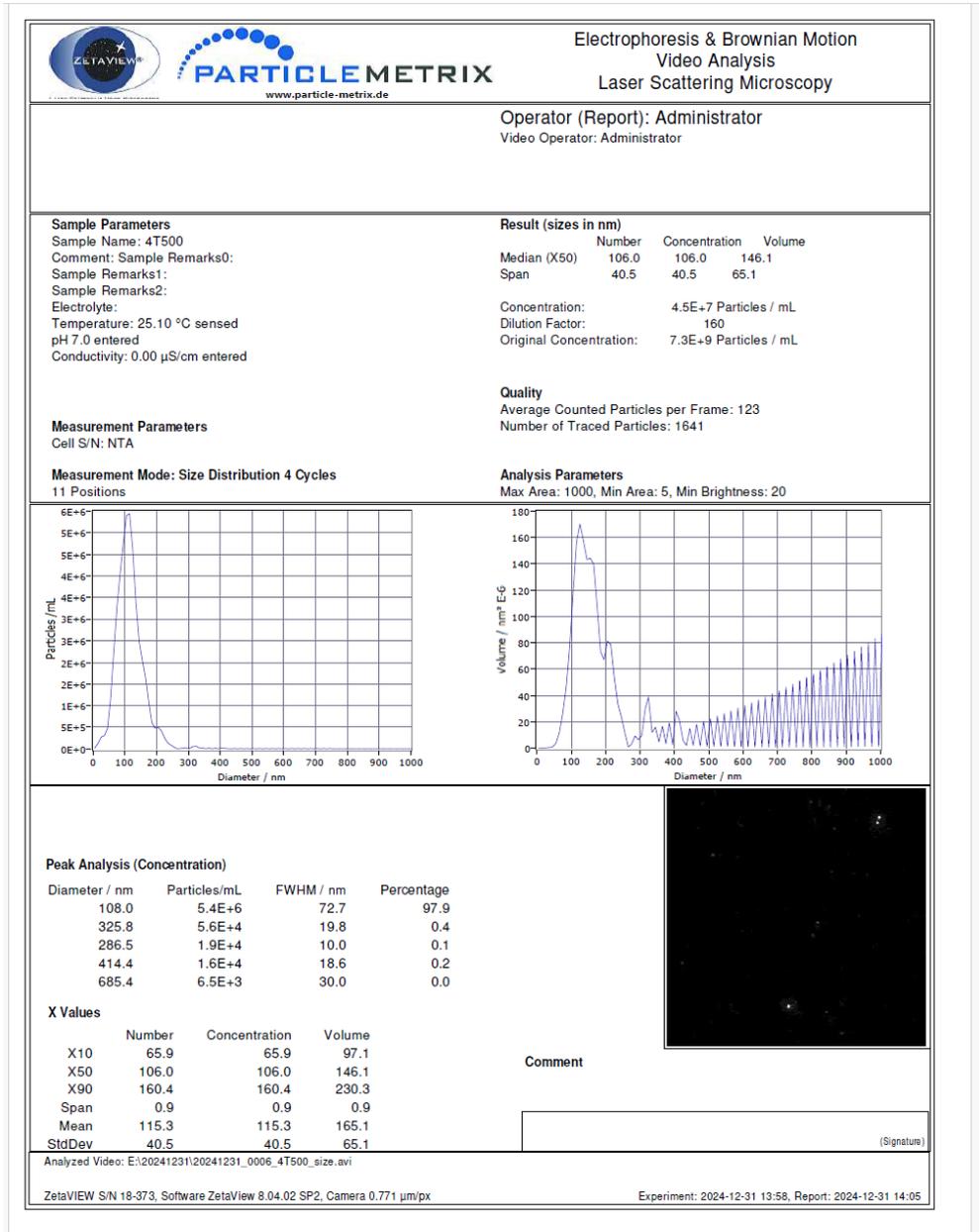


图 2. 人脐带间充质干细胞外泌体粒径与浓度检测（NTA）

收集人脐带间充质干细胞培养上清，利用本公司的外泌体快速纯化试剂盒（简捷型，FRE-05）提取样品中的外泌体，并利用 Zetaview 的仪器检测外泌体的粒径等各项参数。结果表明，提取的外泌体粒径峰值为 106 nm，符合外泌体的大小要求，同时外泌体的原始浓度  $7.3 \times 10^9$  particles/ml。

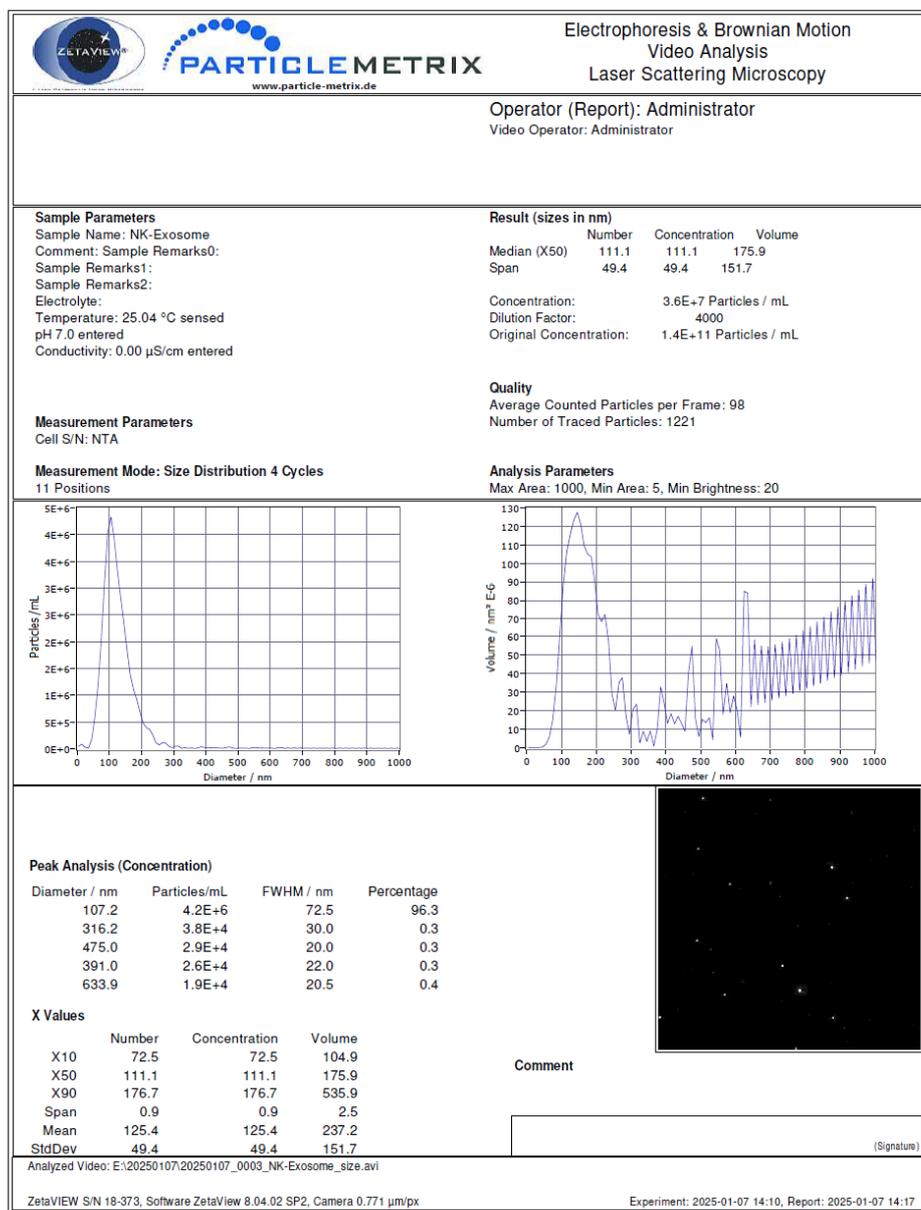


图 3. 人 NK 细胞外泌体粒径与浓度检测（NTA）

收集人 NK 培养上清，利用本公司的外泌体快速纯化试剂盒（简捷型，FRE-05）提取样品中的外泌体，并利用 Zetaview 的仪器检测外泌体的粒径等各项参数。结果表明，提取的外泌体粒径峰值为 111 nm，符合外泌体的大小要求，同时外泌体的原始浓度  $1.4 \times 10^{11}$  particles/ml。

## 七、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。	增加纯化体系中的样品量。
	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。
	未按规定体积添加磁珠，磁珠用量减少。	按照纯化体系要求，使用正确体积的磁珠。
	未按照纯化体系要求，随意更改纯化体系中各试剂比例。	按照纯化体系要求，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，如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，杂蛋白含量低。	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。
	RNA 提取试剂盒不适合。	请选择本公司的外泌体 RNA 提取试剂盒（FRE-04）。