

**安全**

所有试剂不含有毒、有害，或致癌、致畸、致突变成分。

**试剂盒贮存条件**

室温保存

**保质期: 3年**

**Exosome Isolation Handbook**

For Research Use Only

(100ml)

## 试剂盒说明

本试剂盒适用于从血浆、血清、细胞培养液、尿液等提取外泌体。提取原理为聚乙二醇沉淀法，采用最新国外专利技术，获得外泌体大小为 30-150nm，可用于核酸、蛋白的检测分析；由于本方法获得外泌体量大，纯度高，也非常适用于外泌体侵染细胞实验。

1ml 血浆，可提取外泌体约为 200-1000 $\mu$ g；10ml 细胞培养液，可提取外泌体约为 200-1000 $\mu$ g。

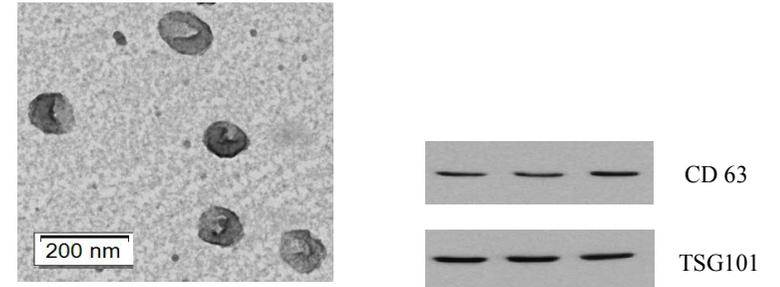
## 试剂盒成分

- |                |       |
|----------------|-------|
| 1. EP Solution | 100ml |
| 2. PS Buffer   | 60 ml |

## 自备耗材

- 0.22 $\mu$ m 滤器(或过滤头)：用于过滤去除残留细胞和碎片
- 适当大小的离心管
- 如 PS Buffer 不够，可自备 1XPBS 缓冲液 (pH7.4) 替代，具有相同效果

## 示例



本试剂盒提取乳腺癌细胞 MDA-MB-231 外泌体的透射电镜 (TEM) 观察和 Western blot 检测外泌体标志物结果

## 外泌体侵染细胞：

如观察外泌体侵染，外泌体荧光染色，可以按照以下方法进行：

外泌体提取液用**荧光染料**\*染色后，用孔径大于 100KD、小于或等于 1000KD 的透析袋，于 1 X PBS（磷酸盐缓冲液 pH7.4）中，透析过夜，去除残留荧光染料后使用；或用孔径大于 100KD、小于或等于 1000KD 的蛋白超滤纯化柱洗脱，去除残留荧光染料后使用。

**\*荧光染料**：即活细胞细胞膜荧光探针，绿色、红色等亲脂荧光染料，如 Dio 或 Dil（碧云天）、PHK（Sigma）等。

如 Dio 或 Dil，用 DMSO 配制浓度为 10mg/ml。外泌体提取液加入 1% 的荧光染料（体积比，如外泌体提取液为 100 $\mu$ l，则加入 1 $\mu$ l 荧光染料），混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

## 外泌体透射电镜（TEM）观察：

外泌体提取液用 1 X PBS 适当稀释后，用 0.22 $\mu$ m 滤器过滤（去除残留的外泌体大团块），再按照透射电镜样本制作要求，制备样本观察。

## 外泌体粒径扫描分析（NTA）：

外泌体提取液按照粒径扫描分析仪要求，用 1 X PBS 适当稀释后，用 0.22 $\mu$ m 滤器过滤（去除残留的外泌体大团块），再上机分析。

## 提取步骤：

1. 为了有效提取外泌体，样本收集量可依照下表：

样品	有效提取量	建议用量
血清（血浆）	$\geq 100\mu$ l	100 $\mu$ l-1ml
细胞培养液	$\geq 3$ ml	3ml-10ml
尿液	$\geq 5$ ml	5ml-20ml

\*样本最小采集量，可满足常规检测需要（如 miRNA、蛋白标记物检测等）；可根据实验需要，适当增加提取量。

\*\*1ml 血浆，可提取外泌体约为 100-500 $\mu$ g；10ml 细胞培养液，可提取外泌体约为 100-500 $\mu$ g（细胞不同，提取量会有区别，浓度为蛋白浓度）。

2. 收集样品于离心管，5000rpm 离心 10min，保留上清；用 0.22 $\mu$ m 滤器(或过滤头)过滤，去除残留细胞及其碎片，收集滤出液于新的离心管中。

3. 混合处理：

### A. 血清或血浆样本

上清液中加入 9 倍体积的 PS Buffer，混匀；加入 1/3 总体积的 EP Solution，混匀（例如，提取 100 $\mu$ l 血浆样本，先加入 900 $\mu$ l PS Buffer 混匀；再加入 1/3 总体积的 EP Solution，即加入量约 333 $\mu$ l）。

### B. 细胞培养液和尿液

上清液加入适量 EP Solution 混匀，加入量依照下表：

样品	样本量 : EP Solution (V/V) *
细胞培养液	3:1
尿液	3:2

\*加入量为体积比

4. 0-4 $^{\circ}$ C 缓慢混匀孵育 1h(可置于低温摇床;或置冰盒中放于常温摇床), 12000rpm

4℃离心 15min，缓慢倒掉上清，倒置于吸水纸上 5min，充分去除上清，保留沉淀（在离心管底部和侧壁，血浆呈淡黄色，细胞和尿液为无色或乳白色；如提取量低，则无明显沉淀，请继续后续步骤）。

5. 加入 500-1000μl PS Buffer，反复吹打沉淀可能存在的部位（如图）3-4min；然后，放 37℃温浴 20min 促进溶解（外泌体沉淀后不易溶解）；然后，再反复吹打沉淀可能存在的部位 2-3min，充分重悬，会获得较高提取量。



### 提取外泌体的粗定量（蛋白浓度）：

可用测定蛋白浓度试剂(如 BCA 试剂、考马斯亮蓝试剂等)，初步测定外泌体提取液，获得的蛋白浓度来间接确定提取外泌体的量，只作为粗定量依据，不能作为最终外泌体提取量。如精确定量，请用颗粒度扫描仪（NTA 等）或电镜确定。

### 保存：

获得外泌体溶液后，短时间可存于 4℃（2-6 天），长时间请置于 -20℃ 或 -80℃ 环境，避免反复冻融。

### 注意：

由于本方法为聚乙二醇提取法，最终获得的外泌体溶液含有微量聚乙二醇。

因此，在后续实验处理过程中，请注意：

①外泌体 DNA 或 RNA 提取：

外泌体提取液可直接使用，无影响。

②外泌体表面蛋白免疫检测（ELISA 等）：

外泌体提取液可直接使用，无影响。

③外泌体蛋白电泳或 Western blot 检测：

外泌体提取液由于含有微量聚乙二醇，会影响蛋白电泳，因此，需要进一步处理，可用透析或超滤

可用孔径大于 100KD、小于或等于 1000KD 的蛋白超滤纯化柱洗脱、浓缩后使用。

也可用孔径用孔径大于 100KD、小于或等于 1000KD 的透析袋，于 1 X PBS（磷酸盐缓冲液 pH7.4）中，透析过夜后使用，如浓度过低，建议丙酮沉淀法进行浓缩，具体方法如下：

外泌体提取液加 4 倍体积丙酮，混匀，-20℃冻存 2h 后，13000 转离心 15min，上清倒干净（如外泌体量不是特别多，底部沉淀一般不明显，可继续后续实验）；再用 90%丙酮轻轻漂洗两次（注意不要太剧烈，避免将底部蛋白冲掉），倒置离心管于吸水纸上，室温放置 10min 晾干，离心管底部为外泌体总蛋白；加入适量蛋白上样缓冲液于离心管底部，吹打重悬，溶解蛋白；煮沸处理，冷却后进行电泳。

④外泌体侵染细胞或动物：

本方法获得的外泌体可直接用于侵染细胞或动物。