

外泌体纯化试剂盒

（磁珠型）

产品编号	试剂名称	规格	保存条件
Ome-01	Buffer EXP	35 mL	4 °C
	Buffer EXN	15 ml	4 °C
	Buffer EXE	50 ml	4 °C
	Buffer EXT	3 ml	4 °C
	Magnetic Beads（磁珠）	2 ml	4 °C
	针式过滤器 A	10 个	RT
	针式过滤器 B	10 个	RT
	说明书	1 份	

一、运输与存储条件。

本产品常温运输，4 °C保存，有效期 2 年。

二、注意事项（请使用试剂盒前阅读此注意事项）。

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 ddH₂O 都必须使用滤膜孔径为 0.2 μm 的滤器过滤，避免液体中的杂质颗粒导致的外泌体纯度降低。
3. 本试剂盒适用于细胞培养上清、尿液及其他液体样品中的外泌体纯化。
4. 本试剂盒不适合提取高度浓缩的细胞培养上清中的外泌体。因为细胞培养上清高度浓缩后，杂蛋白和杂质含量显著升高，能够与磁珠发生非特异性吸附，降低外泌体纯度。
5. 磁珠长期静置存放会沉到管底，吸取磁珠前请先充分混匀（Vortex）。
6. 建议用新鲜提取的外泌体进行 NTA 检测。
7. 外泌体过滤时建议先用 PBS 润洗针式过滤器，以减少外泌体溶液的损失。
8. 纯化后的外泌体可保存在-80 °C冰箱中，避免反复冻融导致的外泌体破裂。
9. 本试剂盒提供的外泌体纯化体系为 20 ml/样品，若样品较少，可以用无菌的 ddH₂O 补齐体积。也可以按照比例减少试剂盒中各试剂的用量（请勿随意更改各试剂比例，易导致外泌体纯化失

败），构建小体系外泌体纯化系统，但每个样品中磁珠用量不得少于 0.2 ml，否则降低外泌体纯化效果。

10. 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。

本产品是一款以磁珠为分离材料的外泌体纯化试剂盒。在特定的缓冲体系中，磁珠可吸附外泌体，并被洗脱液（PBS 或 ddH₂O）洗脱下来，从而完成外泌体的分离与纯化。同时，利用 PBS 或 ddH₂O 洗脱后的外泌体不含其它化合物，可直接用于细胞培养实验和动物体内注射。

四、特点与优势。

1. 本试剂纯化效率高，外泌体纯化回收率高。
2. 本试剂盒纯化的外泌体纯度高，外源杂蛋白含量低。
3. 本试剂盒操作简单，能够快速（2 h）完成外泌体纯化。
4. 本试剂盒操作温和，纯化的外泌体完整性好。
5. 本试剂盒纯化的外泌体不含其它化合物，可直接用于细胞培养实验和动物体内注射实验。

五、使用说明。

1. 本产品主要用于细胞培养上清等体积较大的液体样品中外泌体的分离纯化。
2. 样品准备。细胞培养上清转入离心管，3000 g，4 °C 离心 5 min，弃沉淀，上清转移至新的离心管中，用于外泌体纯化。
3. 磁珠准备。取出试剂盒中的瓶装磁珠，震荡混匀（Vortex）30 sec，利用移液器吸取 0.2 ml 磁珠，加入 50 ml 离心管中，3000 g，4 °C 离心 2 min，弃上清。
4. 磁珠洗涤。加入 10 ml，4 °C 预冷的 PBS，震荡混匀（Vortex）30 sec，3000 g，4 °C 离心 5 min，弃上清。

5. 外泌体纯化体系。本产品提供的外泌体纯化体系是 20 ml，各组份如下表。

表 1. 外泌体纯化体系表

试剂名称	试剂体积 (ml)	试剂比例
Buffer EXP	3	15 %
Buffer EXN	1	5 %
Buffer EXT	0.2	1 %
Magnetic Bead (磁珠)	0.2	1 %
样品	15.6	78 %
合计	20	100 %

6. 外泌体纯化体系配制。根据外泌体纯化体系表，配制外泌体纯化体系，若样品体积不足 15.6 ml 时，可以用 ddH₂O 补齐体积。也可以按照比例减少试剂盒中各试剂的用量（**请勿随意更改各试剂比例，易导致外泌体纯化失败**），构建小体系外泌体纯化系统，但每个样品中磁珠用量不得少于 0.2 ml，否则降低外泌体纯化效果。
7. 孵育。外泌体纯化体系配制完成后，置于旋转混合器中，4 °C 旋转混合 60 min。
8. 磁珠收集。孵育完毕将离心管转入离心机，3000 g，4 °C 离心 5 min，沉淀磁珠，弃上清；或将离心管置于磁力架上，4 °C 静置 5-10 min，使磁珠聚集，弃上清。
9. 残余液体去除。将装有磁珠沉淀的离心管转入离心机，3000 g，4 °C 离心 1 min，用移液器吸尽管中残余液体。
10. 外泌体洗脱。加入 0.3-1.0 ml Buffer EXE（PBS 或 ddH₂O，洗脱液体积较大时，得到的外泌体浓度较低，反之，则高），剧烈振荡（Vortex）30 sec。
11. 外泌体收集。7000 g，4 °C 离心 2 min，将离心管置于磁力架上（**可以有效聚集磁珠，防止磁珠散落在溶液中，降低外泌体纯度**），转移上清至新的 EP 管中，即为纯化的外泌体溶液。
12. 过滤。利用 PBS 润洗针式过滤器 A 和 B（即用这两种滤器过滤 5 ml PBS），并利用针式过滤器 A 过滤外泌体溶液，除去体积较大杂质。滤液再用针式过滤器 B 过滤，除去体积较小的杂质，得到高纯度的外泌体溶液。
13. 纯化的外泌体溶液可立即用于粒径检测（NTA 分析），或保存在 -80 °C。

六、纯化外泌体鉴定（NTA）。

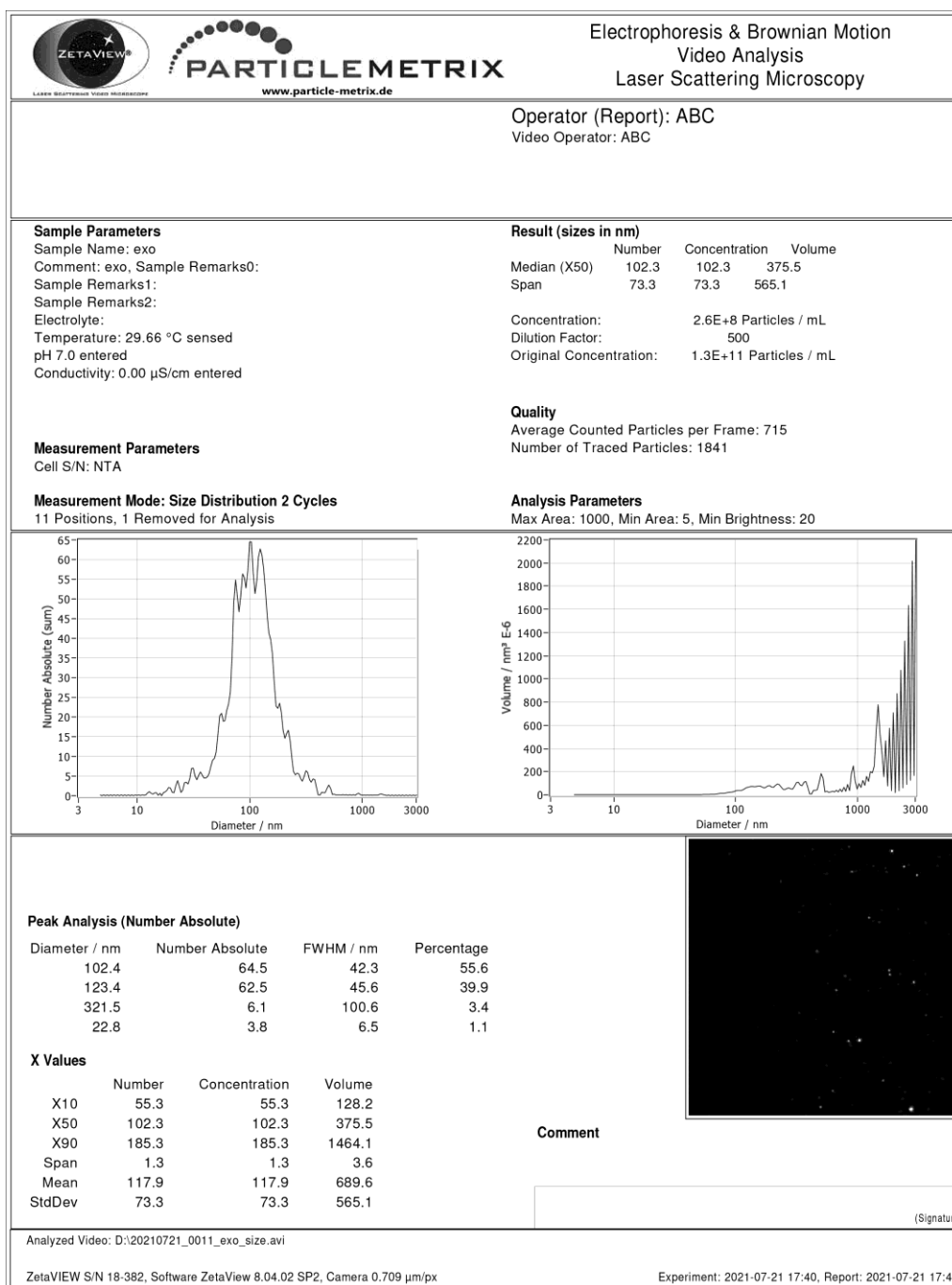


图 1. 脐带间充质干细胞（MSC）培养上清提取的外泌体粒径与浓度检测（NTA）

收集间充质干细胞（MSC）培养上清，利用本公司的外泌体纯化试剂盒（Ome-01）提取外泌体，并利用 ZetaView 公司的仪器检测外泌体的粒径等各项参数。结果表明，提取的外泌体粒径最大峰值为 102 nm，完全符合外泌体的大小要求，同时外泌体的原始浓度 1.3×10^{11} 个/ml，说明外泌体浓度较高。

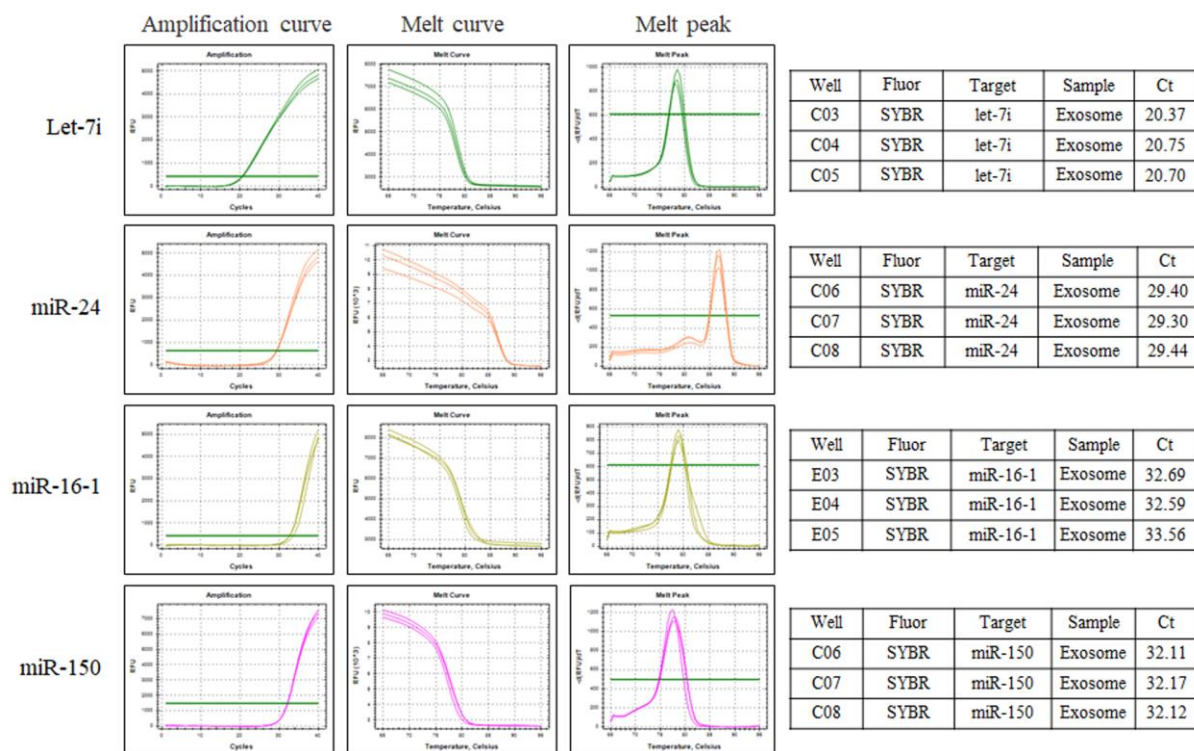


图 2. CIK 细胞培养上清中外泌体 miRNA 检测（实时荧光定量 PCR 法）

收集 CIK（细胞因子诱导杀伤细胞）细胞的培养上清，利用本公司的外泌体纯化试剂盒（Ome-01）提取外泌体，再利用本公司的外泌体 miRNA 提取试剂盒（Ome-05）提取 miRNA，加 Poly A 尾巴后反转录成 cDNA，利用实时荧光定量 PCR 检测外泌体标志 miRNA。结果显示，Let-7i、miR-24、miR-16-1 和 miR-150 四种 miRNA 扩增特异性强，Ct 值稳定，证明外泌体提取效果好，浓度高。

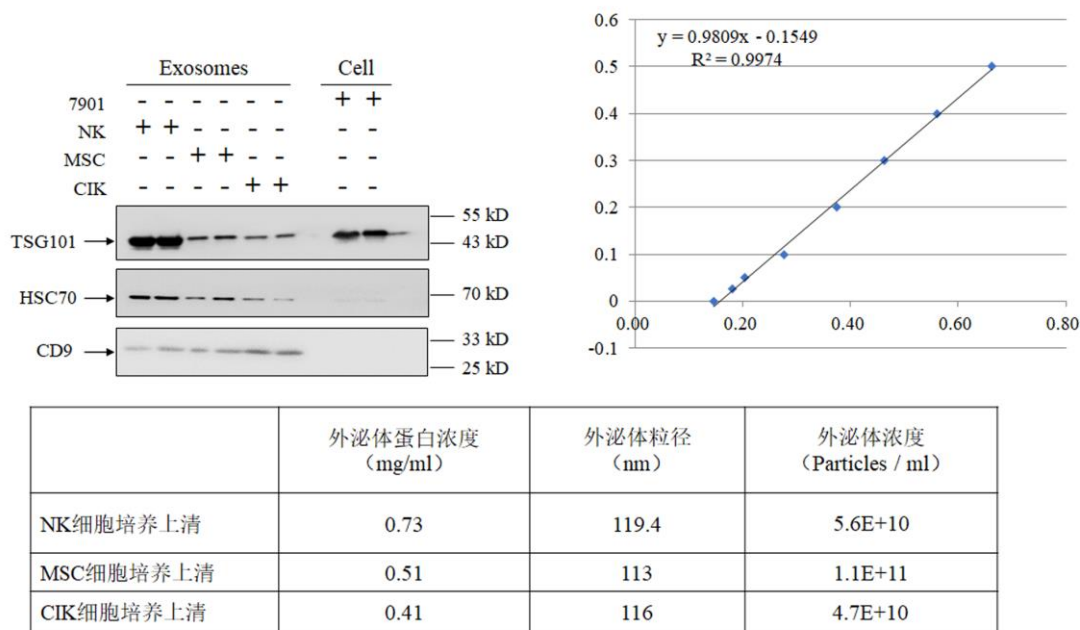


图 3. 三种细胞培养上清中外泌体标志蛋白检测（Western Blot 法）

收集 NK（自然杀伤细胞）、MSC（间充质干细胞）和 CIK（细胞因子诱导杀伤细胞）三种细胞的培养上清，利用本公司的外泌体纯化试剂盒（Ome-01）提取外泌体，利用外泌体蛋白提取试剂盒（Ome-04）提取外泌体蛋白，7901 细胞作为对照。BCA 法测定蛋白浓度，Western Blot 检测外泌体标志蛋白（Marker），包括 TSG101，HSC70 和 CD9。结果表明三种细胞培养上清提取的外泌体中标志蛋白明显，背景清晰，说明提取的外泌体纯度高，浓度大。

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	样品中外泌体含量较少。	更换成外泌体含量较高的样品，或浓缩样品。
	样品用量较少。	增加纯化体系中的样品量，或扩大纯化体系。
	样品反复冻融，外泌体破坏。	使用新鲜的样品。
	样品保存条件不当。	样品长期保存应置于-80 °C。
	样品经过多次滤膜过滤。	减少样品的过滤次数。
	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。	减少洗脱液体积。	
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。
	裂解液裂解能力较弱。	使用裂解能力强的裂解液，或本公司生产的外泌体蛋白提取试剂盒（Ome-04）。
	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。
	提取外泌体的样品为浓缩后的样品，杂蛋白含量较高。	减少提取外泌体时的样品用量，或使用未浓缩的样品。
提取的外泌体 miRNA 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 miRNA 提取时每个样品中的外泌体用量，或扩大 miRNA 提取体系。
	RNA 提取试剂盒不适合 miRNA 提取。	外泌体中 RNA 多为 miRNA，且含量很低，请选择微量 RNA 提取试剂盒，或选择本公司生产的外泌体 miRNA 提取试剂盒（Ome-05）。