

血浆外泌体提取试剂使用说明书

【包装规格】

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|---------|---|------------|
| EK-5202 | Total Exosome Isolation Reagent(from plasma or serum) | 50ml/100ml |
| | 使用说明书 | 1份 |

【保存条件】

4°C 保存，有效期 1 年

【概述】

外泌体是含有复杂 RNA 和蛋白质的小囊泡 (30-120 nm)，所有培养的细胞类型均可分泌外泌体，且外泌体天然存在于体液中，包括血液、唾液、尿液、脑脊液和乳汁中。外泌体被认为是细胞间的信使，在特定细胞之间传递其效应物或向大分子发出信号，然而它们的形成、组成以及涉及它们的生物学途径仍未完全了解。

【操作方法】

I: 样品准备:

1. 取出血浆样品并置于冰上。如果样品是冷冻的，将样品在 25-37°C 的温度下水浴解冻直到完全变成液体，然后放在冰上直到下面操作开始。
2. 室温下以 2000×g 离心血浆样品 20 分钟以去除细胞和碎片。
3. 在不干扰沉淀的情况下将部分澄清的上清液血浆转移到新离心管中。
4. 在室温条件下将新离心管以 10,000×g 离心 20 分钟以去除杂质。
5. 将含有澄清血浆的上清液转移到新管中，不要干扰沉淀，并将其置于冰上，直到准备好进行分离
6. 继续步骤“外泌体分离（用蛋白酶处理）”或“外泌体分离（无蛋白酶处理）”。

IIA:外泌体分离（用蛋白酶处理）：

建议使用蛋白酶K处理以去除大部分血浆中蛋白质，但它可能导致部分暴露在外泌体表面的蛋白质降解（可能蛋白浓度会降低），若这与您的研究内容有冲突，可选择“分离外泌体（未经蛋白酶处理）”操作步骤。

1. 从上一步分离的不含细胞的上清液中取所需体积至新管中，并加入 0.5 倍体积 1×PBS。
2. 将混合溶液彻底涡旋混匀。
3. 向样品中加入 0.05 倍体积的蛋白酶 K。例如：对于 100μl 起始体积的血浆，加入 5μl 蛋白酶 K 溶液。
4. 涡旋样品，将溶液试管置于 37℃ 下孵育 10 分钟。
5. 加入 0.2 倍体积（即总体积=血浆+PBS）的血浆外泌体提取试剂至上述溶液中。

| 总体积=血浆+PBS | 血浆外泌体提取试剂 |
|------------|-----------|
| 100μl+50μl | 30μl |
| 1ml+0.5ml | 300μl |

6. 充分混合经蛋白酶 K 处理的血浆/血浆外泌体提取试剂混合物通过涡旋或倒置直到溶液均匀。（注意：此时溶液应该会轻微混浊。）
7. 将样品在 2-8℃ 下孵育 30 分钟。
8. 孵育后，将样品在室温下以 10,000×g 离心 5 分钟。（注意：对于小鼠血浆，在 4℃ 下离心 30 分钟。）
9. 通过移液器吸出上清液并丢弃，此时外泌体包含在试管底部的颗粒中。
10. （可选步骤）再次以 10,000×g 转速离心试管 30 秒收集任何可能残留试剂，小心吸弃任何残留的上清液。
11. 继续“外泌体重悬”步骤

IIB: 外泌体分离（无蛋白酶处理）：

1. 从上一步分离的不含细胞的上清液中取所需体积至新管中，并加入 0.5 倍体积 1×PBS。
2. 将混合溶液彻底涡旋混匀。
3. 加入 0.2 倍体积（即总体积=血浆+PBS）的血浆外泌体提取试剂至上述溶液中。

| 总体积=血浆+PBS | 血浆外泌体提取试剂 |
|------------------------|-------------|
| 100 μ l+50 μ l | 30 μ l |
| 1ml+0.5ml | 300 μ l |

- 充分混合血浆/血浆外泌体提取试剂混合物通过涡旋或吹打直到溶液彻底均匀。（注意：此时溶液应该会轻微混浊。）
- 将样品在室温下孵育 10 分钟。
- 孵育后，将样品在室温下以 10,000 \times g 离心 5 分钟
- 通过移液器吸出上清液并丢弃，外泌体包含在试管底部的颗粒中。
- （可选步骤）再次以 10,000 \times g 离心管 30 秒收集任何残留试剂，小心吸弃任何残留的上清液
- 继续“外泌体重悬”步骤

III: 外泌体重悬

- 将 1 \times PBS 或类似缓冲液添加到颗粒中并上下涡旋或吸管以重悬外泌体。

| 起始血浆体积 | 重悬体积 |
|-------------|-----------------|
| 100 μ l | 25-50 μ l |
| 1ml | 100-500 μ l |

- 当沉淀重新悬浮之后，所得的外泌体即可进行下游分析或通过亲和层析进一步纯化
- 提纯后的外泌体可在 2-8 $^{\circ}$ C 中保存 1 周或在小于-20 $^{\circ}$ C 中长期保存

【注意事项】

- 血浆分离后尽快进行外泌体分离，保存在 4 $^{\circ}$ C 和-80 $^{\circ}$ C 都会对产量有一定的影响。
- 本品仅限用于科研实验