

IMTP 脂锚试剂盒说明书

Cat#EA-11-1

一、详情

ExoBrooch®是恩泽康泰开发的脂锚试剂盒系列产品，基于相似相溶原理实现外泌体的表面修饰。IMTP 脂锚试剂盒是 ExoBrooch®中的一员，内含 PEG 胆固醇聚合的 IMTP-FAM 靶向肽分子。胆固醇属于两亲物质，同时具有亲油和亲水两种基团，但其亲油性较亲水性强，与磷脂相互作用时可嵌入到磷脂分子之间，将所带目的分子连接在外泌体表面，实现外泌体的表面修饰。IMTP (ischemic myocardium-targeting peptide, CSTSMLKAC) 是通过噬菌体筛选技术获得的可以靶向缺血性心肌组织的靶向肽，常用于缺血性心脏病的相关研究。FAM 为绿色荧光分子，激发光为 488nm，发射光为 525nm。将三者通过化学反应连接，便可在外泌体表面连接上带有绿色荧光标记的 IMTP 靶向肽，是外泌体表面修饰的卓越改造工具。

二、用途

- 共孵育改造：直接采用共孵育方式连接靶向肽分子，获得具有靶向作用的工程化外泌体
- 疾病方向：缺血性心脏病等相关疾病中进行功能分子递送的功能机制研究

三、组分

组分	量	保存条件
IMTP-脂锚靶向肽溶液 IMTP-lipid-anchor Solution	1mg/1ml/1 支	-20℃
共孵育反应液 Reaction Buffer	5ml/1 支	4℃
超滤清洗液 Wash Buffer	150ml/1 瓶	常温

四、注意事项

内容	说明
形式	液体
运输	冰袋运输
保存	-20℃/常温/4℃
使用建议	使用前震荡混匀，操作时注意避光
保存时间	一年
注意事项	1. 避免反复冻融。由于脂锚靶向肽的固有属性，会随着保存时间的延长而聚团，解冻后请尽快使用。 2. 试剂盒所赠为非无菌超滤管（市面没有无菌超滤管），建议超滤产物进行后续实验时，添加抗生素或进一步过滤除菌，超滤管室温保存即可。 3. 建议在超净台操作 避免反复开盖滋生细菌。

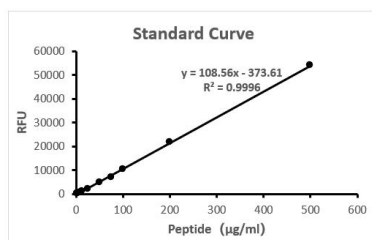
五、操作步骤

- 外泌体准备：通过 SEC+UC 等方式分离纯化外泌体，或直接从恩泽康泰购买纯化好的高纯度外泌体货架产品（外泌体浓度建议高于 $1E+11$ particles/ml）。
- 取 $1.5E+11$ particles（约为 500 μ g）外泌体与 100 μ l 脂锚靶向肽溶液，加入共孵育反应液 Reaction Buffer 为外泌体体积的 1/10。25℃，250rpm，摇动孵育 3 h，再将样品存放于 4℃静置孵育 24 h。
- 样本转移至 100kDa 超滤管（建议使用 Millipore, UFC8100 超滤管）中。
- 加清洗液 Wash Buffer 补齐至 4ml，重悬，常温 4000g 离心 20-30min 至体积约 250 μ l（外泌体来源、浓度、纯度等不同所需离心时间有较大差异，第一次离心过程中注意观察体积：可以不加清洗液，先离心 30s，若液面已经低于两侧滤膜，说明外泌体浓度过低或滤膜破损，会导致外泌体大量损失）。
- 重复步骤 4 两次，最后浓缩样品体积至约 250 μ l（不足 250 μ l 时请用 Wash Buffer 补至 250 μ l），反复轻柔吹打超滤管滤膜上的外泌体后，转移至空的 EP 管中。
- 可选步骤：步骤 5 浓缩至 250 μ l 后继续浓缩至 150 μ l，反复轻柔吹打超滤管滤膜后转移至 EP 管中，再加入 100 μ l 清洗液轻柔吹打超滤管滤膜数十次，转移至同一 EP 管中，混匀，以增加外泌体超滤回收率。
- 取 10 μ l 进行 BCA 或纳米流式 NanoFCM 检测。根据外泌体纯度不同，回收率约为 30%。



8. 取 10 μ l 检测外泌体荧光值。激发光 488nm，在发射光 515nm-535nm 范围内检测被标记外泌体，通过脂锚靶向肽标准曲线计算负载量。

六、范例



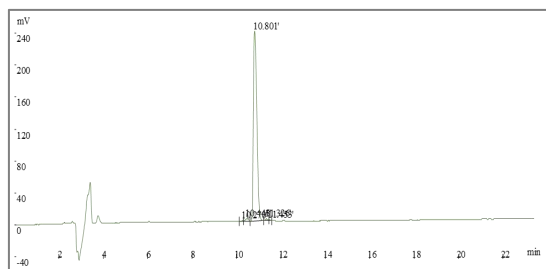
脂锚靶向肽荧光定量标准曲线

荧光值 (5倍稀释)	浓度 (μ g/ml) (5倍稀释)	体积 (μ l)	靶向肽量 (μ g)	BCA浓度 (μ g/ml)	负载量 (nmol/mg)
2290	24.54	250	30.67	615.00	42.21

荧光定量标准曲线计算脂锚反应及纯化后外泌体负载量范例

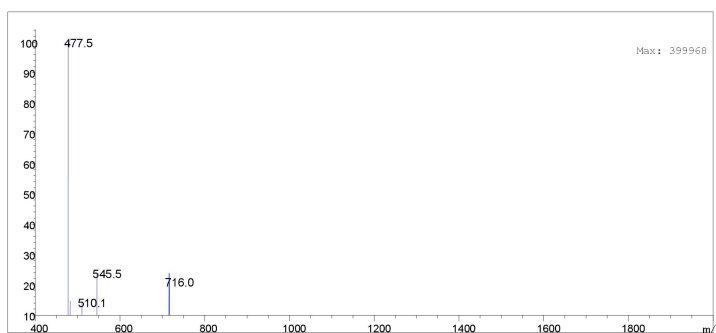
将 IMTP 脂锚靶向肽溶液（初始浓度 1000 μ g/ml）取 20 μ l 依次稀释为 100 μ g/ml、50 μ g/ml、25 μ g/ml、12.5 μ g/ml、6.25 μ g/ml、3.125 μ g/ml、1.5625 μ g/ml 各 100 μ l，混匀取 80 μ l 按顺序加入到 96 孔板中，共孵育纯化后外泌体建议稀释 2-10 倍至 100 μ l，混匀后取相同体积至 96 孔板中用多功能酶标仪检测荧光强度，绘制标准曲线。带入样品荧光值得到负载上的脂锚靶向肽量。通过 BCA 或 NanoFCM 测得脂锚连接后的外泌体蛋白量或颗粒数，并根据脂锚靶向肽总分子量 3946.234（Da）计算得到单位外泌体连接上的靶向肽负载量。

七、附件



Rank	Time	Conc.	Area	Height
1	10.270	0.2093	5148	767
2	10.445	1.2084	29716	2843
3	10.801	97.7168	2402996	236316
4	11.326	0.7376	18138	2072
5	11.453	0.1279	3146	1095
Total		100	2459144	243093

附件 1. IMTP-FAM HPLC 结果



Sample Description	2022-08-03	Instrument	Agilent-6125B	Probe Bias	+4 Skv
Analyzed date	2022-08-03	Probe	ESI	Detector	1 Skv
Sample	CSTSMILKACK(FAM)	Nebulizer Gas Flow	1.5L/min	T. Flow	0.2mL/min
M.W.	1429.65	CDL	-20.0v	B. Conc.	50%H2O/50%ACN
Lot No.	Apep-1003350	CDL Temp.	250 °C		
		Block Temp.	200 °C		

附件 2. IMTP-FAM 质谱结果

