

# iRGD 脂锚试剂盒说明书

Cat#EA-08-1

## 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。iRGD 脂锚试剂盒是 ExoBrooch®中的一员，内含 PEG 胆固醇聚合的 iRGD-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。iRGD (CRGDKGPDC) 是靶向整合素 integrin 的靶向肽，常用于整合素高表达的骨肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、黑色素瘤、肺癌、结肠癌、肝癌等肿瘤的相关研究。FAM 为绿色荧光分子，激发光为 488 nm，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 iRGD 靶向肽，是外泌体表面修饰的卓越改造工具。

## 二、用途

1. 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
2. 疾病方向：整合素高表达的骨肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、黑色素瘤、肺癌、结肠癌、肝癌等肿瘤疾病中进行功能分子递送的功能机制研究

## 三、组分

组分	规格	保存条件
iRGD-脂锚靶向肽溶液 iRGD-lipid-anchor Solution	1mg/1ml/1 支	-20°C
共孵育反应液 Reaction Buffer	5ml/1 支	4°C
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°C/常温/4°C
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	<ol style="list-style-type: none"><li>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。</li><li>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。</li><li>3. 建议在超净台操作 避免反复开盖滋生细菌。</li></ol>

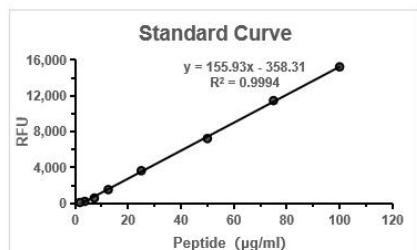
## 五、操作步骤

1. 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）。
2. 取  $1.5E+11$  particles（约为 500 $\mu$ g）外泌体与 100 $\mu$ 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°C，250rpm，摇动孵育 3 h，再将样品存放于 4°C 静置孵育 24 h。
3. 样本转移至 100kDa 超滤管（建议使用 Millipore , UFC8100 超滤管）中。
4. 加清洗液 Wash Buffer 补齐至 4ml，重悬，常温 4000g 离心 20-30min 至体积约 250 $\mu$ 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）。
5. 重复步骤 4 两次，最后浓缩样品体积至约 250  $\mu$ l（不足 250 $\mu$ l 时请用 Wash Buffer 补至 250 $\mu$ 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。



6. 可选步骤：步骤 5 浓缩至 250 $\mu$ l 后继续浓缩至 150  $\mu$ l，反复轻柔吹打超滤管滤膜后转移至 EP 管中，再加入 100  $\mu$ 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。
7. 取 10  $\mu$ 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  $\mu$ 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



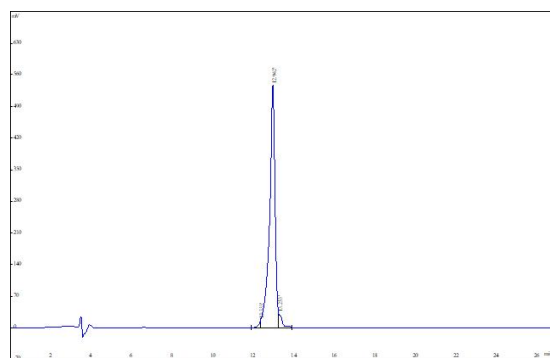
脂锚靶向肽荧光定量标准曲线

荧光值 (5倍稀释)	浓度 ( $\mu$ g/ml) (5倍稀释)	体积 ( $\mu$ l)	靶向肽量 ( $\mu$ g)	BCA浓度 ( $\mu$ g/ml)	负载量 (nmol/mg)
3882	22.6	250	28.25	598.83	47.69

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

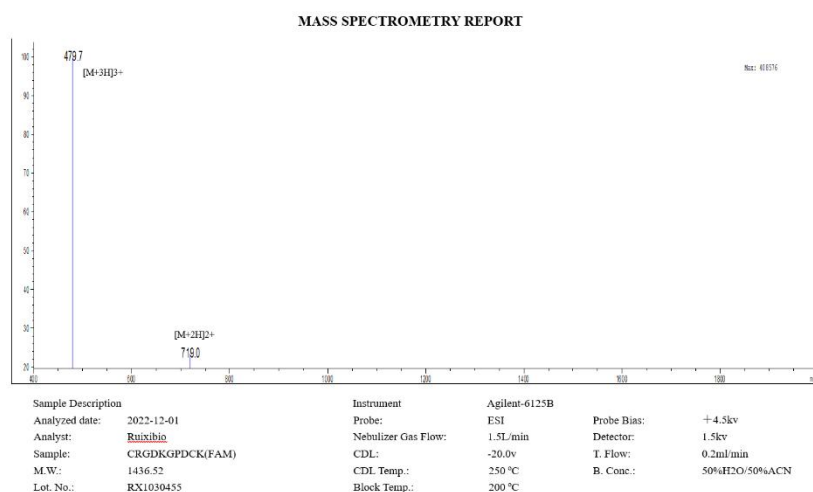
将 iRGD 脂锚靶向肽溶液（初始浓度 1000 $\mu$ g/ml）取 20 $\mu$ l 依次稀释为 100 $\mu$ g/ml、50 $\mu$ g/ml、25 $\mu$ g/ml、12.5 $\mu$ g/ml、6.25 $\mu$ g/ml、3.125 $\mu$ g/ml、1.5625 $\mu$ g/ml 各 100 $\mu$ l，混匀取 80 $\mu$ l 按顺序加入到 96 孔板中，共孵育纯化后外泌体建议稀释 2-10 倍至 100 $\mu$ l，混匀后取相同体积至 96 孔板中用多功能酶标仪检测荧光强度，绘制标准曲线。带入样品荧光值得到负载上的脂锚靶向肽量。通过 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 3956.234（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	Area	Conc.
1	12.333	87435	0.8211
2	12.942	10239455	96.15
3	13.253	322298	3.027
Total			100

附件 1. iRGD-FAM HPLC 结果



Sample Description		Instrument	
Analyzed date:	2022-12-01	Probe:	Agilent-6125B
Analyst:	Ruixibiao	Nebulizer Gas Flow:	ESI
Sample:	CRGDKGPDCK(FAM)	CDL:	1.5L/min
M.W.:	1436.52	CDL Temp.:	250 °C
Lot No.:	RX1030455	Block Temp.:	200 °C
		Probe Bias:	+4.5kv
		Detector:	1.5kv
		T. Flow:	0.2ml/min
		B. Conc.:	50% H2O/50% ACN

附件 2. iRGD-FAM 质谱结果

