

iRGD 脂锚试剂盒说明书

Cat#EA-08

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

- 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：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 iRGD-lipid-anchor	5mg/1 支	-20℃
脂锚靶向肽溶解液 Dilution Buffer	5ml/1 瓶	4℃
共孵育反应液 Reaction Buffer	40ml/1 瓶	4℃
超滤清洗液 Wash Buffer	250ml*3 瓶	常温

四、注意事项

内容	说明
形式	干粉/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	- 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。 - 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。 - 建议在超净台操作 避免反复开盖滋生细菌。

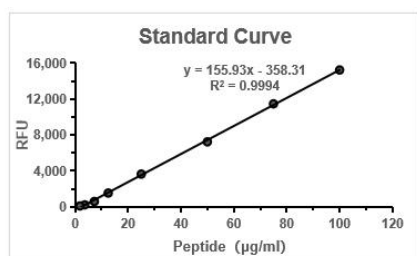
五、操作步骤

- 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）。
- 脂锚靶向肽溶液准备：取 3ml 脂锚靶向肽溶解液加入到 iRGD-脂锚靶向肽中充分溶解后，然后将其转移到剩余 2ml 脂锚靶向肽溶解液的瓶中，浓度为 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，即 $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 。充分溶解后于 -20℃ 保存，为避免反复冻融建议避光分装存放。
- 取 $1.5E+11$ particles（约为 500 μg ）外泌体与 100 μl 脂锚靶向肽溶液（如需扩大体系，外泌体与脂锚靶向肽溶液均等量增加即可），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。



4. 样本转移至 100kDa 超滤管（建议使用 Millipore ,UFC8100 超滤管）中。
5. 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）。
6. 重复步骤 5 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。
7. 可选步骤: 步骤 6 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。
8. 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%。
9. 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



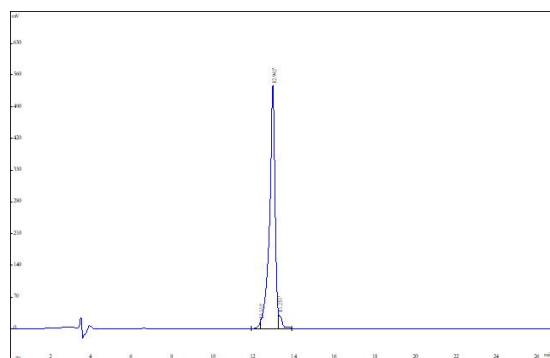
脂锚靶向肽荧光定量标准曲线

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)
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 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 3956.234（Da）计算得到单位外泌体连接上的靶向肽负载量。

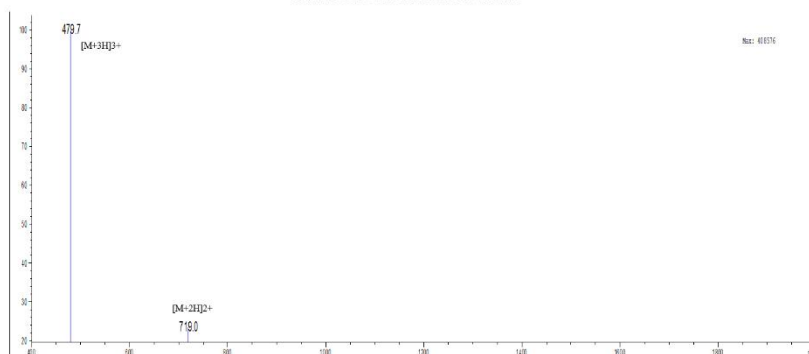
七、附件



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

MASS SPECTROMETRY REPORT



Sample Description		Instrument	Agilent-6125B
Analyzed date:	2022-12-01	Probe:	ESI
Analyst:	Ruixibio	Nebulizer Gas Flow:	1.5L/min
Sample:	CRGDKGPDCK(FAM)	CDL:	-20.0v
MW:	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

该产品仅供科研使用。在使用本产品时遇到任何问题, 欢迎邮件咨询: techservice@ecbobiotech.com

