

RVG 脂锚试剂盒说明书

Cat#EA-06-5

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。RVG-FAM 脂锚试剂盒是 ExoBrooch®中的一员，内含 PEG 胆固醇聚合的 FAM-RVG 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。RVG（YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG）是烟酰乙酰胆碱受体（Nicotinic acetylcholine receptor, nAChR）的靶向肽，常用于脑卒中、帕金森病等神经疾病的研究。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 RVG 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：靶向烟酰乙酰胆碱受体的神经退行性、传染性、炎症、遗传性和肿瘤性等脑部疾病，如神经胶质瘤等脑肿瘤、缺血性脑卒中、重度抑郁、帕金森病、阿尔茨海默病、蛛网膜下腔出血和脑部/胎儿脑部寨卡病毒(ZIKV)感染等，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
RVG-脂锚靶向肽 RVG-lipid-anchor	5mg/1 支	-20℃
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	液体/干粉
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。 4. DMSO 因运输困难，需要客户实验室自备。

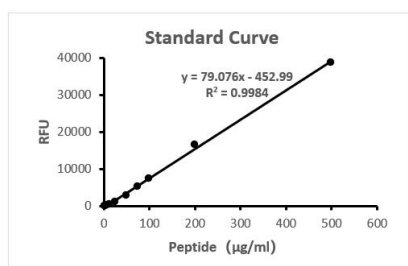
五、操作步骤

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. 脂锚靶向肽溶液准备：取 5ml DMSO 加入到 RVG-脂锚靶向肽中充分溶解，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。
3. 取 $1.5E+11$ particles（约为 $500\mu\text{g}$ ）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



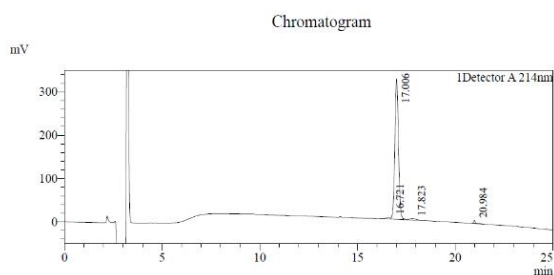
脂锚靶向肽荧光定量标准曲线

荧光值 (10倍稀释)	浓度 (μ g/ml) (10倍稀释)	体积 (μ l)	靶向肽量 (μ g)	BCA浓度 (μ g/ml)	负载量 (nmol/mg)
357	10.24	250	25.61	835.83	19.16

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 RVG 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 6397.394 (Da) 计算得到单位外泌体连接上的靶向肽负载量。

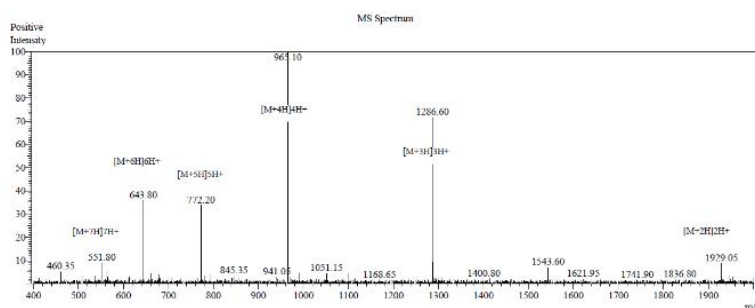
七、附件



Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%
1	16.721	62748	4218	1.407
2	17.006	4242127	324687	95.096
3	17.823	104793	3786	2.349
4	20.984	51244	7197	1.149
Total		4460912	339888	100.000

附件 1. RVG-FAM HPLC 结果



Sample Information

Dissolution method	:15%ACN+85% H_2O	Interface	:ESI	Preced Bias	:+4.5kv
Date Acquired	:2022.05.16 15:25:13	Nebulizing Gas Flow	:1.50L/min	Detector	:0.2kV
Injection Volume	:0.2 μ l	CDL Temp	:250 $^{\circ}C$	T Flow	:0.2ml/min
Block Temp	:200	CDL Volt	:0V	B. concn	:50% H_2O /50% $MeOH$
Order ID	:GTA80742-2(靶肽)				
Name	:scys-YTIWMPENPRFGTPCDFTNSRGKRASNG-K-FAM				
Sequence	:GTA80742-2-0317				
Lot No	:3856.25				
Theoretical	:3856.40				
Observed	:3856.40				

附件 2. RVG-FAM 质谱结果

