

Control 对照脂锚试剂盒说明书

Cat#EA-01-5

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。Control 对照脂锚试剂盒是 PEG 胆固醇与荧光分子的聚合物。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。Control 对照脂锚试剂盒是不含靶向肽的 PEG 胆固醇分子偶联上 FITC 荧光基团，适用于 Exobrooch®靶向肽脂锚系列的对照组实验。

二、用途

用于 Exobrooch®靶向肽脂锚系列的对照组实验，以了解靶向效果是否归因于靶向肽分子。

三、组分

组分	规格	保存条件
Control 对照-脂锚 Control-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

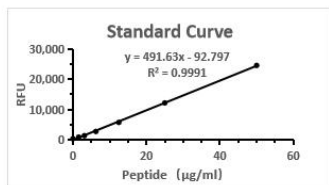
- 外泌体准备：通过 SEC+UC 等方式分离纯化外泌体，或直接从恩泽康泰购买纯化好的高纯度外泌体货架产品（外泌体浓度建议高于 $1E+11$ particles/mL）。
- 脂锚溶液准备：取 5mLDMSO 加入到 Control 对照脂锚中充分溶解，浓度为 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，即 $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 。充分溶解后于 -20℃保存，为避免反复冻融建议避光分装存放。
- 取 $1.5E+11$ particles（约为 $500\mu\text{g}$ ）外泌体与 $100\mu\text{L}$ Control 对照脂锚溶液（如需扩大体系，外泌体与脂锚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。
- 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 $250\mu\text{L}$ （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 5 两次，最后浓缩样品体积至约 $250\mu\text{L}$ （不足 $250\mu\text{L}$ 时请用 Wash Buffer 补至 $250\mu\text{L}$ ），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 6 浓缩至 $250\mu\text{L}$ 后继续浓缩至 $150\mu\text{L}$ ，反复轻柔吹打超滤管滤膜后转移至 EP 管中，再加入 $100\mu\text{L}$



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 μL 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 μL 检测外泌体荧光值。激发光 488nm，在发射光 515-535 nm 范围内检测被标记外泌体，通过脂锚标准曲线计算负载量。

六、范例



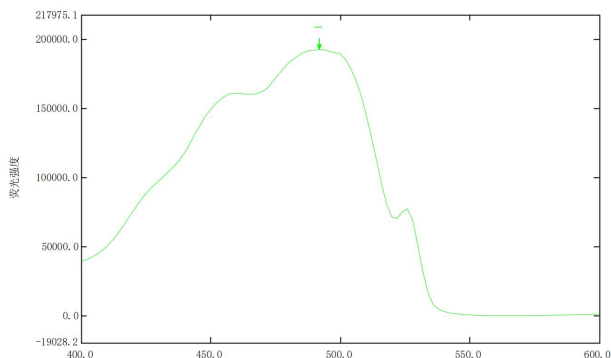
脂锚靶向肽荧光定量标准曲线

荧光值 (5倍稀释)	浓度 ($\mu\text{g/ml}$) (5倍稀释)	体积 (μL)	靶向肽量 (μg)	BCA浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	负载量 (nmol/mg)
4902	10.16	250	12.7	664.17	27.55

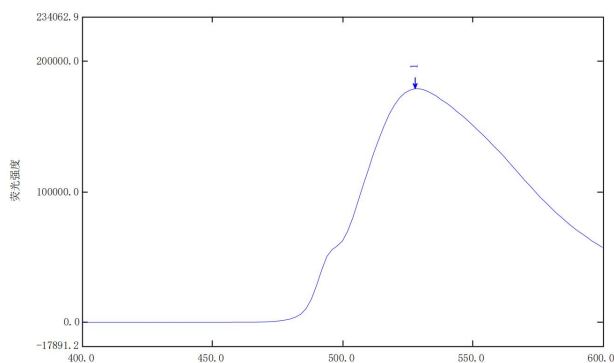
荧光定量标准曲线计算脂锚反应及纯化后外泌体负载量范例

将 Control 对照脂锚溶液（初始浓度 1000 $\mu\text{g/mL}$ ）取 20 μL 依次稀释为 100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 、6.25 $\mu\text{g/mL}$ 、3.125 $\mu\text{g/mL}$ 、1.5625 $\mu\text{g/mL}$ 各 100 μL ，混匀取 80 μL 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 μL ，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，并根据脂锚总分子量 2776 (Da) 计算得到单位外泌体连接上的脂锚负载量。

七、附件



附件 1. 胆固醇-PEG-FITC 激发光谱结果



附件 2. 胆固醇-PEG-FITC 发射光谱结果

