

【产品名称】

Exosupur®外泌体纯化试剂盒

货号: ES933

【产品简介】

本试剂盒是专门用于从细胞上清、尿液等非复杂样本中提取细胞外囊泡的纯化试剂盒。试剂盒采用分子排阻色谱的原理,根据被分离样本中组分的分子尺寸大小实现外泌体的分离。本试剂盒具有快速、高效、操作简单、对设备要求低等特点,可在60min内完成外泌体的分离纯化。提取的外泌体产物质量稳定可靠、蛋白污染程度低,可用于蛋白提取分析、RNA提取分析、细胞功能检测等下游生物学实验。

【规格和组成】

3根/盒

组分名称	数量
Exosupur®柱*	3根
说明书	1份

*每根柱子一次最多可处理浓缩后的样本3ml (处理≤1ml)的样品,推荐使用本公司另一产品,货号: ES914)

【实验室自备试剂及注意事项】

1. 无菌PBS溶液(须用0.22μm滤膜过滤,建议新鲜配置或采购已过膜的PBS, 4℃冰箱保存的PBS溶液需先平衡至室温)

2. 封柱液: 20%无水乙醇(须超声条件脱气20min或配置好后静置过夜)

3. 超滤管(截留分子量100kD)或Exosupur®样本前处理试剂盒 (可对大体积样本一次性30-50倍浓缩)

4. 收集管(50ml离心管)

5. 样品(上样前需平衡到室温,单根柱子单次上样体积为3ml)

6. 选购产品: 排阻柱固定支架 (货号ES933S, 也可用铁架台替代)、适配器 (货号ES93A, 便于加样或冲洗, 也可无需适配器分次加)

7. 请注意使用过程中勿将柱子从高处摔落或摔打, 以免导致柱床碎裂, 如出现上述原因导致的柱床碎裂现象不能享受退换货服务。

【保存和运输】

常温运输, 收到试剂盒后请于4℃直立存放, 有效期12个月。

【操作步骤】

1. 样品预处理

样品预处理可在下步柱平衡期间同时进行, 首次操作建议先做好样本预处理再进行纯化操作。

①细胞上清: 收集细胞上清, 300g离心10min去除死细胞, 3000g离心10min去除细胞碎片, 0.22μm微孔滤膜过滤。滤出液再通过100kD超滤管 (4000g离心浓缩10-20倍) 或Exosupur®样本前处理试剂盒 (按说明书操作, 浓缩30-50倍) 进行体积浓缩, 浓缩后的细胞上清备用。

②尿液: 尿液充分涡旋1min后, 先3000g离心10min去除沉淀, 上清进行0.22μm微孔滤膜过滤, 滤出液浓缩后备用。

其他类型样本预处理, 可参考文献或联系techservice@ecbobiotech.com。

2. 柱平衡

①将Exosupur®排阻柱从4℃冰箱取出, 可用试管架等进行垂直固定。如实验室没有合适的垂直固定装置, 可从我司购买配套的固定分离组件(产品货号: ES933S)。

②实验前先将排阻柱室温放置30min以上, 使柱子温度充分平衡到室温(18℃-25℃)。温度过低或过高, 影响分离效果。

③将废液收集管(普通离心管或者烧杯均可)放置于排阻柱下方, 取下柱子顶盖, 弃去筛板上方的封柱液(直接倒掉或者用移液器吸去), 加入60ml即两倍柱体积的PBS* (可分次加, 也可采购适配器。适配器插紧以防漏液), 取下柱子底部的底盖, 开始冲洗柱子(流速约为0.52-0.60ml/min)。待PBS流尽后, 取下适配器, 盖上底盖, 可直接上样或加入4ml PBS备用。

*注意事项: 尽量使用当天新配的经过0.22μm滤膜过滤的PBS, 或采购的已过膜的PBS, 避免引入微生物及颗粒污染。如果使用4℃冰箱保存的PBS溶液, 必需平衡到室温后再用, 否则有可能在柱子中引入大量气泡。

3. 样品上样

①取下排阻柱底盖, 用移液器吸去上筛板上面的PBS, 加入室温平衡好的3ml的样品(注意: 若样品不足3ml, 建议加PBS补至3ml, 再混匀上样, 避免因上样体积小造成的外泌体馏分偏移)。

②待样品全部进入筛板, 底部出口无液体流出后, 开始加洗脱液PBS(建议每次添加1ml洗脱液, 待上一个1ml洗脱液全部进入排阻柱内后, 再添加下一个1ml洗脱液), 用收集管(50ml离心管)收集流出液, 从第一滴流出液开始计算, 每1ml流出液记为1个馏分, 该产品前4个馏分为不含外泌体组分的空隙体积, 不用收集。(注意: 也可以直接加入4ml的PBS溶液洗脱不收集)。

4.外泌体收集

①高回收率收集方案：立即收集空隙体积之后的5个外泌体馏分(即馏分5, 6, 7, 8, 9), 每个馏分1ml。(注意：如不区分馏分可直接加入5mlPBS洗脱到一个收集管里, 以减少加样和收样操作步骤)

②高纯度外泌体收集方案：弃去前面的1-5个馏分共5ml, 只收集外泌体浓度最高的6, 7, 8馏分, 每个馏分1ml。(注意：如不区分馏分可直接加入3mlPBS洗脱到一个收集管里, 以减少加样和收样操作步骤)。

③对于说明书中包含的样本类型, 可以按上述步骤进行外泌体收集; 如果用非常规样本进行实验, 因为样品粘稠度等因素可能会影响外泌体组分在排阻过程中的动态分布, 建议在正式实验前使用荧光纳米微球(100nm)添加至您的样品中, 进行预实验标定荧光微球的分布。标定过程中每1ml流出液作为一个馏分, 收集20个馏分, 使用Qubit测定每个馏分的荧光值, 确定需要收集的馏分。如果不确定如何准备样品, 请联系技术支持(techservice@ecbobiotech.com)。

④测定收集产物的颗粒浓度和蛋白浓度, 根据实验的下一步应用目的, 决定是否需要收集到的外泌体产物进行进一步的浓缩富集。如需要进行浓缩, 建议使用100kD超滤管, 4000g离心浓缩到目的体积即可。

5.Exosupur®柱的维护

①再生：收集完目的外泌体馏分之后, 用至少60mlPBS冲洗柱子进行再生操作。再生后的柱子加入4mlPBS备用或直接用于新的样本处理; 若需下次再处理样本, 请用30ml封柱液冲洗后, 再加入4ml封柱液(浸没上筛板即可), 4℃直立存放保存。

*封柱液配制: 含20%体积的乙醇的去离子水。(注意: 新配置的封柱液务必要超声脱气后再使用, 也可配置后静置过夜使用。)

②清洗: 变性的蛋白或脂质复合物很难在再生步骤中被洗脱下来, 积累过多会对分离过程的纯度及精度产生较大影响。可以通过下面的清洗消毒步骤来去除: 总计加入30ml 0.5M NaOH清洗柱子, 然后用PBS缓冲液冲洗柱子, 直至流出液的pH值为中性。

【注意事项】

1.对于新的柱子, 上筛板和凝胶填料表面之间可能会有一定的空隙, 这是储存过程中凝胶沉降造成的, 并不影响其性能, 实验前将筛板向下推动至填料表面即可。

2.使用者需要自配无菌PBS或直接采购的已过膜的PBS。为了尽可能的减少分离过程微生物核酸及蛋白污染物的引入, 请使用无菌水配PBS溶液, 配置后尽早使用0.22μm无菌滤器进行过滤除菌。新配置的PBS缓冲液超声脱气操作可以减少实验中在柱子中产生气泡, 减少对分离参数的影响。

3.当囊泡馏分用于后续高通量测序或者其他组学分析时, 为避免交叉污染建议一根柱子只处理一个样本。

4.多次重复使用后, 因为重力等原因柱子松紧度及分离参数会发生变化, 建议每根柱子的重复使用次数不多于5次。

5.每次实验时, 可以记录2mlPBS缓冲液通过排阻柱所需要的时间(先用30mlPBS清洗除去封柱液, 再加PBS测试流速), 正常在3:20-3:50, 流速显著减慢预示柱子被堵住或被污染, 需要进行30ml 0.5M NaOH清洗消毒处理。

6.Exosupur®柱清洗消毒频率依据实验防污染级别, 建议细胞上清样本处理一次就清洗消毒一次。清洗消毒可以最大程度减少排阻柱的微生物污染, 避免微生物核酸及蛋白的引入。另外, 当回收使用的柱子储存时间过久, 柱子有颜色变化或者流速有显著变化时, 建议进行柱子清洗消毒操作。

【结果展示】

对浓缩的细胞上清进行排阻分离操作, 通过BCA测定Exosupur®排阻柱的各个馏分的蛋白浓度, 通过纳米流式测定各个馏分的颗粒数, 如图1所示。

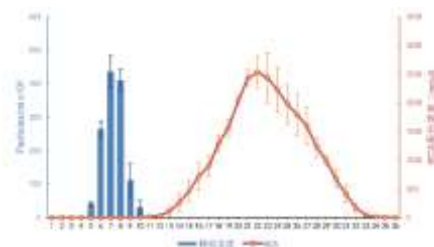


图1.Exosupur®分离3ml浓缩细胞上清的效果

从图1中可以看出: 使用本产品Exosupur®排阻柱处理3ml浓缩细胞上清样本时, 外泌体的富集十分明显, 且主要存在于6、7、8三个馏分中。而杂蛋白主要存在于10号之后的馏分。大于12的馏分通常含有高浓度的杂蛋白不建议做外泌体分析。

【生产企业】北京恩泽康泰生物科技有限公司

单位名称: 北京恩泽康泰生物科技有限公司

单位地址: 北京市大兴区宝参南街华润生命科学园1号楼108

邮编: 102609

电话/传真: 010-69739599

邮箱: techservice@ecbobiotech.com

公司网址: <http://www.echobiotech.com/>

【排阻柱组成的示意图】



【使用前请微信扫码观看操作示范】

