

Exosupur®细胞上清 2 步法快速外泌体纯化试剂盒 操作说明书

Cat#ESSO500 规格:500ml

一、详情

Exosupur® 细胞上清 2 步法快速外泌体纯化试剂盒，基于自主专利开发（专利号:ZL201811302563.0），可对细胞上清、尿液、脑脊液等成分简单的样本进行快速、大通量外泌体分离纯化，纯化后的外泌体可以直接进行表征相关检测以及细胞学和动物实验。无需超高速离心设备，解决了传统超速离心方法步骤繁琐、依赖于超高速离心机设备、预约困难、耗时费力等难题。

二、组分

组分	体积*数量	保存条件	运输条件	保质期
A 液	180ml*1	2-8°C保存	常温运输	2 年
B 液	80ml*1	2-8°C保存		
过滤柱	40 Tubes	常温保存		

三、注意事项

- 1.A 液较为粘稠，使用前平衡至室温，吸取时需小心，可使用剪掉尖端的枪头或注射器吸取。
2. 使用过程中，尽量在无菌环境开启瓶盖，以减少对试剂的污染。

四、自备试剂耗材

高速离心机(6000g-10000g)；50 ml 离心管；1.5 ml 离心管；1X PBS 溶液。



操作流程示意图



五、操作步骤

1. 样本预处理：

①收集细胞上清，300g 4°C 离心 10min 去除死细胞，3000g 4°C 离心 10min 去除细胞碎片，10000g 4°C 离心 10min 去除杂质碎片至无明显沉淀，0.22μm 微孔滤膜过滤。

注：如果细胞上清中添加了高比例胎牛血清，如 10% FBS，使用本产品无法有效去除其中富含的脂蛋白等杂质，需要结合超离、排阻色谱(Exosupur® ES9P11e/ES9P14e)等方法进一步除杂。

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

本产品适合无血清培养的细胞上清及尿液、脑脊液、羊水等大体积样本，即外泌体浓度较低且成分比较简单的大体积样本，进行外泌体分离纯化。如本身外泌体浓度极低想提高得率可先在上述处理后，先用 100KDa 超滤管对上清进行 3-5 倍浓缩，再进行后续步骤。

其他类型样本预处理方法，请参考文献或联系 [techservice@echobiotech.com/13051338639](mailto:techservice@echobiotech.com)。

2. 外泌体提取：

(1) 按照细胞上清：A 液：B 液体积比为 7: 2: 1，先加入 A 液，再加入 B 液。

	细胞上清体积 (ml)	A 液 (ml)	B 液 (ml)	总体积 (ml)
范例	10	2.9	1.4	14.3
	25	7.143	3.571	35.714
	50	14.3	7.1	71.4
50ml 离心管内 最多加入量	35	10	5	50

- (2) 将混合液上下颠倒混匀，4°C 静置过夜（不少于 12h）。
- (3) 将混合液置于离心机 10000g 4°C 离心 60min。如果总体积大于 50ml，可以混匀后均分到不同离心管进行离心。注意：由于离心后离心管底部的外泌体可能为透明的，建议提前根据离心后外泌体所在大致位置进行标记，以便后续弃去上清时减少损失。
- (4) 离心后的液体自上而下小心吸去上清，若体积较大时可直接小心倾倒弃去上清液，再 10000g 4°C 离心 2min(可选)后，用移液枪吸尽残余上清。
- (5) 样本重悬：建议每 25ml 上清用 0.5ml PBS 溶解重悬沉淀(如沉淀量较多可增加 PBS 至 0.8ml 左右)，重悬体积约为初始体积的 1/30-1/50。
- (6) 将含有重悬液的离心管置于离心机 12000 g 4°C 离心 2 min，取上清液。



3. 外泌体纯化：

- (1) 将收获的溶液加入过滤柱中，单个过滤柱最大上样量为 0.5ml，置于离心机 3000g 4℃离心 10min，离心后收集过滤柱底部液体，此液体即为纯化后的外泌体。（若离心后发现柱子上方仍有残余液体，可再次延长离心时间或混匀后转移至新的过滤柱中再次离心纯化，将管底液体收集到同一离心管中。）
- (2) 外泌体的保存：纯化后的外泌体 1 周内使用可于 4 度短暂存储，如短期不用可适量分装冻存于-80℃冰箱中，以备后续实验使用。

六、常见问题与解决方案

1. 外泌体重悬时出现较难溶解？

出现这种情况可能是细胞上清浓度较高，浓缩倍数过大造成。建议先加入少许体积如 0.2ml，反复吹打尝试溶解，溶解后再补至需求体积吹打混匀，仍存在未完全溶解的现象时建议可室温静置 30min 后再次重悬，为增加得率尽可能混匀。

如上述操作后上清液中仍有大量沉淀，可离心多次至无明显沉淀，每次取离心上清液至新离心管。

2. 离心机离心力达不到 10000g？

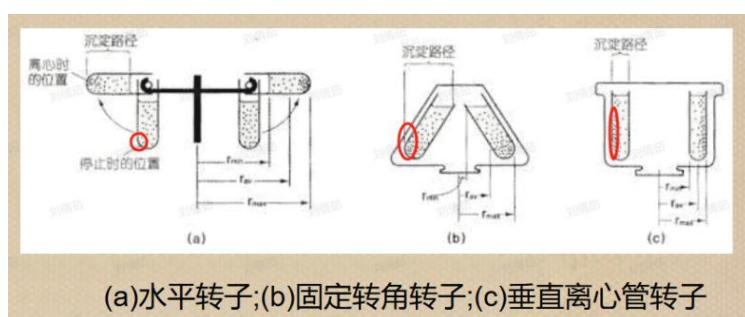
建议离心力可以减少到 6000g 并 4℃离心 60min。时间的减少或者离心力的降低对于回收率有一定的影响，可以根据自己样本情况，进行评估。

3. 加入 A 液和 B 液混匀后，4℃静置孵育最长多久？

建议 12h 起，但不建议超过 24h。

4. 孵育过夜离心之后无沉淀，这个现象正常吗？

由于某些细胞上清外泌体含量比较低，加了 A 液和 B 液离心之后肉眼无法观察到沉淀，建议：a. 离心前根据离心后外泌体所在大致位置进行标记，以便后续弃去上清时减少损失。b. 离心后在重悬时使用 PBS 仔细吹打离心管壁四周和底部；提取后的外泌体应先进行 NTA/NanoFCM 颗粒浓度或 BCA 蛋白定量检测，再决定是否进行后继实验。



本产品仅供科研使用。

