

Exosupur®组织外泌体分离试剂盒

Cat#ES9T-01 规格：500mg*1T

一、详情

组织外泌体研究聚焦于特定组织来源的细胞外囊泡 EVs，从组织层面为深入了解 EVs 的功能和应用提供了独特视角。目前组织来源 EVs 研究主要聚焦于：1) 联合体液外泌体筛选疾病特异性 EVs 标志分子；2) 组织 EVs 介导的组织损伤修复、致病机制以及器官间通讯研究；3) 将易获取的组织 EVs 作为工程化 EVs 原料进行小分子、小核酸、多肽等货物装载递送。

组织 EVs 的分离相较于细胞上清和体液等样本存在很多难点，本试剂盒专门用于解决各类新鲜组织来源 EVs 的高效分离纯化，例如肿瘤组织、心脏组织、脑组织、肺组织、肝组织、肠道组织、肾脏组织、脾脏组织、肌肉组织等，得到的组织 EVs 可用于电镜 TEM、nanoFCM/RPS/NTA 粒径分析、核酸分析、蛋白分析、细胞实验和动物实验等。

二、自备耗材仪器

- 1) 0.01M PBS 溶液（4℃预冷）；
- 2) 1.5mL 离心管、15mL 离心管、50mL 离心管、0.22μm 滤膜、10mL 注射器、移液枪等无菌耗材；
- 3) 培养皿(无菌)、冰盒、手术刀(消毒)、37℃恒温水浴锅、高速离心机(10000g)等。

三、组分

组分	体积*数量	保存条件	运输条件	保质期
EMix 溶液	80 μL *1 管	-20℃	冰袋运输	1 年
Buffer PI	13 μL *1 管	2-8℃		
稀释 buffer	3 mL*1 管	2-8℃		
A 液	2 mL*1 管	2-8℃		
B 液	1 mL*1 管	2-8℃		
70μm 滤膜	1 个	常温		
过滤柱	2 个	常温		

四、注意事项

- 1) EMix 溶液使用前和后应保存于-20℃条件下，建议分装后使用，避免反复冻融；



- 2) 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。
- 3) 使用过程中，尽量在无菌环境开启瓶盖，减少对试剂的污染。
- 4) 本试剂盒单 Test 最多处理 0.5g 组织，如组织>0.5g，比如 0.75g 可分成 2 份按照 2 个 Test 进行操作。

五、操作步骤

1、样本准备：

- 1) 活体取材后立即剔除结缔组织和脂肪组织等非研究所需的组织类型，使用预冷的无菌 PBS 或生理盐水清洗血水污渍等，用无菌纱布/吸水纸等吸干表面的液体。如果暂时不处理，请将组织于 4°C 短暂保存，保存时间不宜超过 6-8h。
- 2) 提前将 EMix 溶液置于 4°C 或冰上融化并混匀；
- 3) 准备一个冰盒，取一个培养皿放于冰盒上，将待分离的新鲜组织($\leq 0.5\text{g}$)取出放于平皿上，保持低温环境，利用手术刀对组织进行切割，切成 2mm^3 左右的小块，全部转移至 50mL 离心管中。

2、组织解离：

- 1) 向 50mL 离心管中依次加入 3mL 稀释 buffer 和 80 μL EMix 溶液。
- 2) 将上述离心管转移至 37°C 水浴锅中孵育，孵育过程每隔 3-5min 摇匀一次，总计孵育 10-20min。注意：组织类型不同，孵育时间会有所调整。（一般情况下 15min 即可）
- 3) 37°C 孵育结束后将组织解离液放置在冰上，加入 1mL 4°C 预冷的 PBS，混合后加入 12.5 μL Buffer PI，混匀。
- 4) 将 70 μm 滤膜插在 15mL 离心管管口，上述液体倒入 70 μm 滤膜过滤到 15mL 离心管中。
- 5) 再次加入 1mL 4°C 预冷的 PBS 至原 50mL 离心管中，简短震荡冲洗离心管，再次倒入 70 μm 滤膜，滤液收集至上述 15mL 离心管中。
- 6) 加入 1mL 4°C 预冷的 PBS 至 70 μm 滤膜冲洗膜上残渣，滤液收集至上述 15mL 离心管中。（注意：过膜后膜上残渣为酶解组织）

3、组织解离液差速离心：

- 1) 将上述 15mL 离心管于 4°C，300 $\times g$ ，离心 10 min，转移上清到新的 15mL 离心管



中。

- 2) 4°C, 2,000×g, 离心 10 min, 转移上清到新的 15mL 离心管中。
- 3) 4°C, 10,000×g, 离心 20 min, 上清转移到新的 15mL 离心管中。(注意：此步离心后得到的沉淀可用于分离大囊泡。如果需要提取大囊泡则保留沉淀，而后用 PBS 重悬沉淀继续 4°C, 10,000×g, 离心 20 min 得到的沉淀即为大囊泡)
- 4) 上清液用 10mL 注射器通过 0.22μm 滤膜过滤进入 15mL 离心管中，再次加入 PBS 到注射器内，清洗滤膜至终体积为 7mL。

4、提取外泌体：

- 1) 按照上清液：A 液：B 液体积比为 7：2：1，先加入 A 液，再加入 B 液，参考下表：

	上清液体积 (mL)	A 液 (mL)	B 液 (mL)	总体积 (mL)
范例	7	2	1	10

- 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。（注意：由于离心后离心管底部的外泌体可能为透明的，所以可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：建议重悬体积为初始上清的 1/20-1/30。可以先考虑用 0.23mL PBS（即 1/30）溶解重悬管壁的沉淀（先用 0.13mL 重悬溶解后转入离心管，再用 0.1mL 重悬管壁以增加回收率），根据重悬情况，如果不能完全溶解可适当缩小倍数即增加重悬的 PBS 到 0.35mL（即 1/20）。
- 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（即为组织 EVs 粗提物）。

5、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°C 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：3-7 天内可于 4°C 短暂存储，如短期不用可适量分装冻存于 -80°C，以备后续实验使用。
- 3) 如外泌体电镜效果不佳，或想要更高纯度的外泌体，4.6 步得到的上清液（组织 EVs 粗提物）可进行分子尺寸排阻色谱（推荐 Exosupur® ES9P11e）或者进行 100,000 g 以上超高速离心再次纯化。

该产品仅供科研使用

