

# ExoCoupl<sup>®</sup> 外泌体表面修饰生物正交偶联试剂盒

Cat# EC-01-02 规格:6T

## 一、详情

ExoCoupl™ 外泌体表面修饰生物正交偶联试剂盒，是恩泽康泰开发的基于生物正交反应实现外泌体表面修饰的试剂盒。首先通过室温生物正交反应在外泌体表面添加活性基团，再通过活性基团与叠氮键（N3）的反应，将与叠氮偶联的小分子/多肽/核酸等有效成分共价结合到外泌体表面，实现外泌体的表面修饰。叠氮偶联的有效成分合成比较方便，无电性、分子类型等限制，合成后使用本试剂盒即可连接在外泌体表面。

本偶联试剂盒操作便捷，仅需 2 步共孵育和 2 步纯化操作，外泌体表面装载效率高可媲美脂锚共孵育，但非特异性吸附更低。

## 二、用途

- 1、治疗性小分子、小核酸、多肽等有效成分的外泌体装载；
- 2、提高外泌体靶向性的靶向肽表面装载，比如脑神经靶向肽 RVG、缺血心肌靶向肽 IMTP、泛癌或炎性细胞靶向肽 iRGD 等。

## 三、自备材料

- 1) N3 和荧光基团标记的小分子/多肽/核酸等有效成分，建议分子量 < 4KDa；荧光基团可以是 FAM、FITC 等，以方便进行装载量检测(注意避光保存，操作过程中使用棕色避光管或锡箔纸包被以免荧光淬灭)；建议合成好的干粉用 DMSO 溶解为 1mg/ml 的溶液。为方便阐述，本试剂盒以 FITC 荧光为例，表述为 N3-目的分子-FITC 溶液。
- 2) 2mlEP 管、锡箔纸或棕色避光管；
- 3) 低速离心机、旋转混匀仪。

## 四、组分

组分	规格	保存条件	运输条件
外泌体生物正交标记 BCR 溶液 Bioorthogonal Chemistry Reaction Solution for EV	100µg/100µl/1 支	-20℃，避光	冰袋运输
袖珍柱 Re-purification Pocket Column	12 套(含柱子、外管 下盖各 12 个)	柱子直立存放 常温	
通用缓冲液 Universal Buffer	50ml/1 瓶	常温	
N3-FITC 对照品 N3-FITC Positive Control	30µg/30µl/1 支	-20℃，避光	

## 五、注意事项



内容	说明
使用建议	液体溶液使用前请震荡混匀，操作时注意避光
保存时间	一年
注意事项	1. 避免反复冻融。由于生物正交反应物的固有属性，会随着保存时间的延长而效果变弱，BCR 溶液解冻后请尽快使用或分装冻存。 2. 建议在超净台操作 避免反复开盖滋生细菌。

## 六、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（货号 CTE-06/CTE-061/CTE-05，外泌体浓度建议高于 1E+11 particles/ml）。
- 正交标记：**取 500  $\mu$ l 外泌体，加入 15  $\mu$ l 生物正交标记 BCR 溶液，混合均匀后将样品避光室温静置孵育 2 h。
- 袖珍柱预处理：**取 1 支袖珍柱，拧断柱子尾部。将柱子放回离心柱外管中，500 $\times$ g 离心 30s 去除储存液，弃去外管中的废液。洗柱：取下顶部螺旋盖子，向柱子中加入 600  $\mu$ l 通用缓冲液，500 $\times$ g 离心 30s 清洗柱子，弃去外管中的废液。重复前述洗柱步骤两次。
- 纯化外泌体：**将柱子置于一个收集管（EP 管）中，盖上柱子下盖后，将样品全部加入，盖上顶部螺旋盖子拧紧；将柱子放置在旋转混匀仪上，室温下 80rpm 混合 30 min。取下下盖将柱子放入新的 2ml EP 管中，500 $\times$ g 离心 30 秒，收集流出液（约 500  $\mu$ l）。
- 目的分子装载：**
  - 可选步骤：**N3-FITC-对照品为实验过程阳性对照，带有 FITC 荧光，负载到外泌体后可通过酶标仪（激发光 488nm，发射光 515nm-535nm）快速检测负载量。取 10  $\mu$ l N3-FITC-对照品溶液加入步骤 4 纯化后的外泌体流出液（约 500  $\mu$ l）中，混合均匀后将样品避光室温静置孵育 2 h。
  - 正式实验：**取适量体积用户自备 N3-目的分子-FITC 溶液（干粉用 DMSO 溶解为 1mg/ml，体积计算公式=合成分子总 MW\*10/1000  $\mu$ l），加入步骤 4 纯化后的外泌体流出液（约 500  $\mu$ l）中，混合均匀后将样品避光室温静



置孵育 2 h。

6. **再次纯化外泌体：**另取 1 支新的袖珍柱重复步骤 3 预处理，并按照步骤 4 加载样本纯化，以去除游离 N3-FITC-对照品或 N3-目的分子-FITC，得到外泌体终产物。

7. **载量测定：**

1) 外泌体终产物定量：取 10  $\mu$ l 进行纳米流式 NanoFCM 检测颗粒数浓度检测或 BCA 总蛋白含量检测。

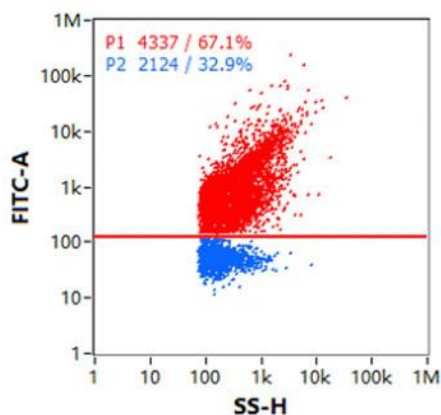
2) 酶标仪检测计算负载量：将合成的已知浓度(1000 $\mu$ g/ml)的 N3-目的分子-FITC 溶液作为标准品，取 2 $\mu$ l 加入 398 $\mu$ l 通用缓冲液稀释 200 倍为 5 $\mu$ g/ml，而后依次取 100 $\mu$ l 加入 100 $\mu$ l 通用缓冲液中，经 2 倍倍比稀释为 7 个浓度梯度标准品各自混匀；外泌体终产物样本原倍检测或使用通用缓冲液稀释约 2 倍至 100 $\mu$ l 混匀；如仍不在标曲内可自行修改标曲浓度梯度；各浓度标准品和样本均取 80 $\mu$ l 加至 96 孔板，用多功能酶标仪检测荧光强度（激发光 488nm，发射光 515nm-535nm），绘制 N3-FITC-目的分子标准曲线，并根据标准曲线和样本稀释倍数换算负载量。最终再除以外泌体 BCA 总蛋白量或总颗粒数，即可得到单位 mg 外泌体目的分子载量或每 1E+11 particles 外泌体的目的分子载量。

3) 阳性率检测：直接取 10  $\mu$ l 终产物外泌体进行 NanoFCM 阳性率检测，阳性率=携带目的分子的外泌体颗粒数/所有外泌体的颗粒数。

上述步骤 2 和 3 选择其中的一种即可，更推荐使用步骤 3。

## 七、实验数据

采用 3E+11 Particles/ml 293F 外泌体参考品(CTE-06)，室温融化后，根据实验步骤进行生物正交标记和 N3-FITC-对照品偶联实验，完成后进行纳米流式检测，负载阳性率如下图所示：



## 八、补充说明



- 1、用户需自行合成带荧光基团且叠氮键偶联的药物分子，若合成有困难可以联系技术支持为您推荐合成供应商。
- 2、建议目的分子的分子量 MW 不大于 4 kD，以得到最佳的偶联效果。若分子量较大，可以在实验步骤 5 中适当增加投量，初始建议的投量计算方式为合成分子总  $MW \times 10 / 1000 \mu l$ （N3-目的分子-FITC 的浓度为 1 mg/ml）。
- 3、袖珍柱最大上样体积不超过 600  $\mu l$ 。
- 4、外泌体溶液中避免含有 Tris、甘氨酸等含有胺的物质。

## 九、FAQ

- 1、使用多功能酶标仪检测荧光后，如何计算载量？

将合成的已知浓度(1000 $\mu g/ml$ )的 N3-目的分子-FITC 溶液作为标准品，取 20 $\mu l$  加入 180 $\mu l$  通用缓冲液稀释 10 倍为 100 $\mu g/ml$ ，而后依次取 100 $\mu l$  加入 100 $\mu l$  通用缓冲液中，经 2 倍倍比稀释为 7 个浓度梯度标准品各自混匀；外泌体终产物样本使用通用缓冲液稀释约 2-10 倍至 100 $\mu l$  混匀；各浓度标准品和样本均取 80 $\mu l$  加至 96 孔板，用多功能酶标仪检测荧光强度（激发光 488nm，发射光 515nm-535nm）。

- ◆ 根据标准品的酶标仪检测荧光值和相应浓度（ $\mu g/ml$ ），得到标准曲线： $y = Ax + D$
- ◆ 稀释的外泌体终产物酶标仪检测荧光值：B（EU）
- ◆ 外泌体终产物稀释倍数：n
- ◆ N3-目的分子-FITC 的分子量：M（Da）
- ◆ 外泌体终产物总量：BCA 检测浓度为 C（ $\mu g/ml$ ）

那么，单位外泌体脂锚靶向肽总载量（nmol/mg）=  $[(B-D)/A] \times n / M / C \times 1000000$

- 2、负载后的外泌体如何保存？

为获得最佳结果建议尽可能使用新鲜样本，但由于实验条件的限制，可能无法每次都能使用新鲜样本。为保证阳性颗粒占比建议 4℃放置 3 天内，最多不能超过 7 天，-20℃放置 2 周内，样本尽可能避免反复冻融（冷冻前可适量分装）。

该产品仅供科研使用。在使用本产品时遇到任何问题，欢迎邮件/电话咨询。

