

## 通用外泌体分离试剂盒（SEC法）

货号：P-CA-503

规格：1Box (3EA)

### 一、产品描述

本试剂盒基于分子排阻色谱原理，根据被分离组分分子大小差异进行外泌体的分离。具有操作简便、高纯度和高回收率等优点，特别适用于大体积样本中的外泌体分离。分离的外泌体可用于 WB 分析、NTA 或纳米流式粒径分析、电镜检测、组学研究、细胞和动物功能研究等。

### 二、产品组成

组分名称	1 Box (3 EA)	保存条件
Exosome Purification Column (30 mL)	3 EA	2-8°C
Column Adapter (30 mL)	3EA	2-30°C

### 三、保存条件

试剂盒冰袋运输，外泌体纯化柱 2-8°C 保存；保质期 18 个月。

### 四、适用样本

最常用于细胞培养上清、尿液等大体积样本，也适用于血清、血浆等样本。其他微量珍贵样本，请向本公司技术人员咨询。

### 五、自备仪器、试剂和耗材

- 高速冷冻离心机
- 离心管
- 废液槽/缸
- 超滤管（MWCO: 50 kDa）
- 无菌PBS（现配现用，0.2 μm 过滤，超声或真空脱气）
- 20%乙醇（现配现用，0.2 μm 过滤，超声或真空脱气）
- 纯化柱固定器（Purification Column Stand）

### 六、使用方法

#### 1. 样品预处理

1) 去除细胞。4°C，300 g，离心 5 min，转移上清到新的离心管；

**注意：**对无细胞的样品，可以跳过此步骤。

2) 去除细胞及细胞碎片。4°C，2000 g，离心 10 min，转移上清到新的离心管；

3) 去除大体积颗粒。步骤 2) 得到的上清，4°C，14000 g，离心 30 min，转移上清到新的离心管。

#### 2. 纯化柱预处理



- 1) 提前将纯化柱 (Exosome Purification Column (30 mL)) 安装在纯化柱固定器 (Purification Column Stand) 上, 纯化柱下面放置废液槽。放置于室温 30 min 以上, 恢复室温;

注意: 纯化柱需充分平衡至室温 (18-25°C), 温度过低或过高, 都会影响外泌体分离效果。

- 2) 检查纯化柱下端是否充满液体。如果纯化柱下端无空气, 可以跳过该步骤; 若纯化柱下端存在空气, 将纯化柱倒置, 打开下端密封帽, 用移液器或注射器取水或 20%乙醇顶出空气, 在密封帽中充满水或 20%乙醇, 再盖上密封帽, 放回固定器上;
- 3) 先打开纯化柱顶盖, 再打开下端的密封帽, 弃去纯化柱上的封柱液 (可直接倒掉或者用移液器吸取), 将适配器 (Column Adapter (30 mL)) 与纯化柱连接, 并从顶部加入加 2 倍柱体积 (60 mL) PBS 平衡纯化柱, 至下方没有溶液流出。清洗过程中, 纯化柱的顶部筛板必须始终保持湿润。冲洗完成后, 盖上底端密封帽, 断开适配器, 加入 3 mL PBS 备用。

- a. 注意要先打开纯化柱上盖, 再打开下端的密封帽, 否则空气将进入纯化柱中, 影响外泌体分离效果。
- b. 在整个外泌体分离纯化过程中, 纯化柱的顶部筛板必须始终保持湿润, 否则影响外泌体分离效果。
- c. 需要向纯化柱中加入大体积溶液时, 可以将适配器与纯化柱连接, 将溶液加入到适配器中。
- d. PBS 推荐新鲜配制并经 0.2  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 或采购商业化无菌的 PBS, 避免微生物或颗粒物污染。PBS 溶液使用前, 必须平衡到室温, 否则纯化柱中可能出现大量气泡, 影响外泌体分离效果。

### 3. 分离外泌体

- 1) 样品上样。移除纯化柱中的 PBS, 在上方加入 3 mL 样本; 样本不足 3 mL, 可用 PBS 补至 3 mL, 混匀后上样。取下纯化柱底部密封帽, 等待样本全部进入纯化柱内后, 再加 PBS;
  - a. 如果样品体积超过 3 mL, 建议试用 50 kDa 超滤管浓缩样品至 3 mL, 注意浓缩体积不超过 20 倍。超滤浓缩方法详见超滤管的说明书。
  - b. 对于高粘度样本, 如血浆、血清、高粘度胸腹水等样本, 可取 1.5 mL 样本, 用 PBS 稀释至 3 mL, 混匀后上样。
  - c. 必须待样品全部进入筛板后, 再加入 PBS, 避免样品被稀释影响分离效果。
- 2) 外泌体分离。先在纯化柱下方准备好 1.5 mL 离心管, 然后在纯化柱上方加入 1 mL PBS。待下方收集到 1 mL 馏分后, 可加下一次 1 mL PBS, 换新的 1.5 mL 离心管收集。根据流出顺序分别标记馏分管编号。
- 3) 外泌体收集。收集 8、9、10、11、12 号馏分管即可获取外泌体, 其中 9、10、11 号馏分管的外泌体浓度更高。收集液可直接测定外泌体颗粒数和蛋白浓度。
- 4) 外泌体浓缩。测定收集外泌体的颗粒浓度和蛋白浓度, 根据后续实验要求, 决定是否对外泌体收集液进行浓缩。如浓缩, 建议使用 MWCO 50 kDa 的超滤管, 4000 g 离心浓缩到目的体积即可。

### 4. 纯化柱维护



- 1) 收集完所有馏分后，将适配器与纯化柱连接，并从顶部加入至少 2 倍柱体积（60 mL）PBS 清洗纯化柱，至下方没有溶液流出。
- 2) 再加 1.5 倍柱体积（45 mL）的 20%乙醇清洗纯化柱，至下方没有溶液流出。
- 3) 最后取下适配器，向纯化柱中加入 5 mL 20%乙醇的封闭液，安装纯化柱顶盖，然后在密封帽中充满 20%乙醇，盖到纯化柱下端出口，置于 4°C 直立保存。

## 七、产品优势

1. 样本体积兼容范围广 0.1-3 mL 样本体积都兼容；
2. 纯化外泌体纯度高 可直接用于鉴定检测或外泌体示踪和功能研究等；
3. 操作简单 重力柱模式无需专业的纯化设备，对场地设备要求少，时间短；
4. 回收率高 可自由选馏分管蛋白污染程度低，分离出的组分无蛋白污染。

## 八、注意事项

1. 新购买或使用后的纯化柱，上筛板和白色琼脂糖微球之间可能会出现一定的空隙，这是储存和使用过程中凝胶沉降造成的，并不影响纯化柱的性能，将上筛板向下推至无空隙即可正常使用；
2. 纯化柱保存在封闭液中，封闭液为20%乙醇。20%乙醇建议现配现用，同时经0.2 μm滤膜过滤、超声或真空脱气，避免造成纯化柱出现大量气泡，影响分离效果；
3. 每次纯化柱使用前需要使用无菌并平衡至室温的PBS清洗。PBS建议现配现用，同时经0.2 μm滤膜过滤、超声或真空脱气，避免造成纯化柱出现大量气泡，影响分离效果；
4. 纯化柱中间不能有气泡，使用前需认真检查，避免影响实验；
5. 纯化柱可以反复利用，但是多次使用会影响效果，建议重复使用不超过5次；
6. 当分离的外泌体进行NGS或者其他组学分析时，为避免交叉污染，建议每个样品使用一支新的纯化柱。

