



# Magneti-G 外泌体亲和纯化试剂盒

## 目录

1. 产品介绍	1
2. 使用方法	2
3. 注意事项	2
4. 参考信息	3
5. 常见问题与解答	4
6. 试剂盒组成	5
7. 订购信息	5
8. 相关产品	5

## 1. 产品介绍

### 1.1 Magneti-G 商标

Magneti-G 商标来自磁性 (Magnetic) 的英文谐音, G 为高聚物的缩写, 因此带有这一商标的产品, 均为高聚物材质的磁性微球。后续将根据客户的需求, 基于 Magneti-G 磁珠开发更多相关产品。

### 1.2 外泌体功能介绍

外泌体和其他细胞外囊泡 (EVs) 属于细胞膜囊泡, 包含蛋白, mRNA, microRNA, DNA 和脂类。外泌体直径 30-150nm, 多种细胞在正常及病理状态下均可分泌外泌体, 其主要来源于细胞内溶酶体微粒内陷形成的多囊泡体, 经多囊泡体外膜与细胞膜融合后释放到胞外基质中, 且外泌体天然存在于体液中, 包括血液、唾液、尿液、脑脊液和乳汁中。外泌体具有多种多样的功能, 其功能取决于其所来源的细胞类型, 其可参与到机体免疫应答、抗原提呈、细胞迁移、细胞分化、肿瘤侵袭等。

### 1.3 外泌体的形成过程

膜双层通过磷脂的不对称分布来维持脂质的“多面性”。外膜富含磷脂酰胆碱和鞘磷脂, 而内膜主要由磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 和磷脂酰乙醇胺形成。微泡由质膜出芽形成, 主要原因是由于  $\text{Ca}^{2+}$  通过磷脂双分子层破坏了膜的不对称性, 导致磷脂跨膜双层的重新分配, 促进膜起泡, 最终导致出芽过程的进行, 出芽形成芽泡, 将泡体中的外泌体释放到细胞外, 这样就形成了一个完整的外泌体。

### 1.4 试剂盒组份

Magneti-G 外泌体亲和纯化试剂盒将外泌体结合蛋白定向偶联至高聚物磁珠上, 采用亲和纯化的方法进行外泌体的纯化, 该方法可以很方便获得高纯度的外泌体。该试剂盒利用中性 pH 的洗脱液, 很温和的将捕获的 EVs 从磁珠上洗脱下来, 可以获得完整的外泌体, 纯化的完整外泌体和其他 EVs 可用于不同实验, 包括 WB 检测, 电镜分析, 纳米粒子追踪分析, 纳米流式等。

表1: 试剂盒组分

试剂盒成份	名称	备注
亲和纯化磁珠	Magneti-G Exosome Affinity Beads	偶联了外泌体亲和蛋白的磁性高聚物微球
	Exosome- Wash Buffer	去除非特异性吸附, 提高外泌体纯度
相关缓冲液	Exosome-Binding Buffer	促进外泌体和亲和纯化磁珠的结合
	Exosome-Elution Buffer	温和洗脱缓冲, 中性pH

### 1.5 磁珠性质

高聚物磁珠采用高分子聚合技术将超顺磁性材料和高分子材料完美地结合在一起, 具有更快的磁响应性同时保持微球良好的分散性、极低的非特异性吸附和更丰富的结合位点, 已被广泛应用于免疫分析、核酸分离提取、细胞分选、酶的固定等多个领域。Magneti-G Exosome Affinity Beads 是利用共价修饰的方法将外泌体结合蛋白偶联至高聚物磁珠上, 纯化方法简单、高效便捷。磁珠性能见表 2。



表2: Magneti-G Exosome Affinity Beads 产品性能

项目	性能
微球基质	高聚物磁性微球
配体	外泌体结合蛋白
粒径	1 $\mu\text{m}$
磁珠浓度	10 mg/ml
储存缓冲液	20mM Tris (pH=8.0), 0.02% Tween20, 0.02% NaN <sub>3</sub>

### 1.6 样本选择

Magneti-G 外泌体亲和纯化试剂盒适用于多种样本的外泌体纯化, 我们测试过培养基上清、血清、血浆以及尿液样本, 都有非常好的外泌体纯化效果, 但植物外泌体没有进行测试, 客户如有需求可自行检测。

### 1.7 保存与运输

运输: 冰袋运输, **不可冻结**。

保存: 2-8 °C 冷藏保存, **不可冻结**。

## 2. 使用方法

### 2.1 样品预处理

取待纯化的样品进行差速离心, 首先用 300g 离心 10min, 继续收集上清, 再用 2000g 离心 10min, 最后用 10000g 再离心 10min, 将收集的上清用 0.22 $\mu\text{m}$  的滤膜进行过滤处理(可选), 如果样本体积较大可以配套使用本公司外泌体快速纯化试剂盒进行浓缩, 浓缩方法参考外泌体快速纯化试剂盒说明书, 随后在上清中加入 5% (V/V) 样品体积的 Exosome-Binding Buffer, 上下颠倒混匀。

### 2.2 磁珠预处理

本产品用于外泌体纯化制备的实验, 1ml 磁珠能够处理不超过 50ml 体积的样本, 载量  $\geq 10^9$  particles/ml, 可根据样品中外泌体的含量的预估加入对应体积的磁珠, 也可以直接取 1 ml 的磁珠与 30-50 ml 样本(不含 Exosome-Binding Buffer 体积)与孵育进行实验, 后续可根据初步实验的数据进行修正。取出计算好的磁珠置于磁力架上, 待磁珠完全吸附后弃去保存缓冲液, 用 Exosome-Wash Buffer 清洗 5 次, 1 ml 磁珠加入 1 ml Exosome-Wash Buffer, 注意让磁珠尽量全部吸附, 吸取的时候尽量不要吸到磁珠, 磁珠损失会影响载量。

### 2.3 孵育和洗杂

将处理过的 Magneti-G Exosome Affinity Beads 加至样品中在 4°C 摇晃孵育 1-2h, 随后将磁珠置于磁力架上静置, 待磁珠完全吸附后吸去上清, 加入一定体积的 Exosome-Wash Buffer 轻轻颠倒混匀 3-5 次, 再将悬液置于磁力架上, 同样待磁珠完全吸附在离心管壁后吸弃上清, 重复 5 次, 1 ml 磁珠加入 1 ml Exosome-Wash Buffer。

### 2.4 样品洗脱

洗脱 Buffer 选用 Exosome-Elution Buffer, 进行 3-4 次分管洗脱, 1ml 磁珠加入 0.5ml 洗脱液进行摇晃洗脱, 每次洗脱时间 5min, 摇晃要尽量轻柔, 防止外泌体在洗脱过程中破碎。

### 2.5 外泌体保存与应用

将收集的外泌体溶液保存于 -20°C 或 -80°C 冰箱中, 尽量避免反复冻融, 可分装以备下游检测和应用。如需无菌培养, 可使用 0.22  $\mu\text{m}$  无菌过滤器进行过滤收集。

## 3. 注意事项

- 1) 本产品保存在 2-8°C 冰箱中, 不要冻结保存;
- 2) 本产品出现轻微团聚属正常现象, 可正常使用;
- 3) 外泌体较脆弱, 建议尽量在低温下进行操作, 防止外泌体活性受损, 影响下游实验;
- 4) 提取的外泌体保存在 -20°C 或 -80°C 中, 可保存半年时间, 外泌体分装使用, 尽量避免反复冻融;
- 5) 样本中不要含有金属离子螯合剂。

## 4. 参考信息

### 293 细胞外泌体纯化:

- 1) 取 30ml 培养基上清, 差速离心去除颗粒沉淀, 加入 5% 的 Exosome-Binding Buffer;
- 2) 加入 1ml 已经清洗过的磁珠, 混合均匀后放置振荡器上, 室温孵育 1 h;
- 3) 将含有磁珠的样品管转移到磁力架上, 分离磁珠和液体, 用移液器吸走上清, 留下磁珠;
- 4) 用 Exosome-Wash Buffer 清洗 5 次后加入 Exosome-Elution Buffer, 每次洗脱孵育 5 min, 重复洗脱三次;
- 5) 对洗脱产物进行标志物蛋白的 WB 检测、纳米流式检测以及电镜检测, 结果请见图 1—3。

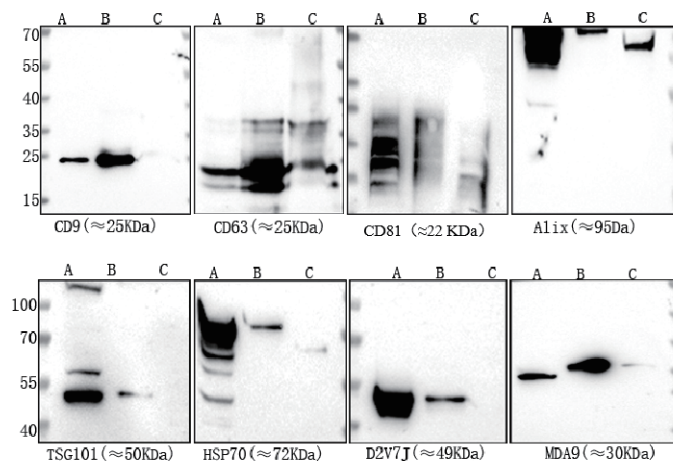


图1.Magneti-G外泌体纯化试剂盒纯化外泌体的WB电泳图

将洗脱的外泌体进行 WB 检测, WB 抗体购自 CST 的 Human Reactive Exosome Marker Antibody Sampler Kit (80610)。图 1 中 A 为外泌体快速纯化试剂盒(BK0047)纯化的外泌体, B 为 Magneti-G 外泌体亲和纯化试剂盒纯化的外泌体, C 为对照厂家商品化产品纯化的外泌体。从图 1 中可以看到, 使用 Magneti-G 外泌体亲和纯化试剂盒和外泌体快速纯化试剂盒(BK0047)提取的外泌体几个主要标志物都有较高的阳性, 较商品化试剂而言, 得率更高。

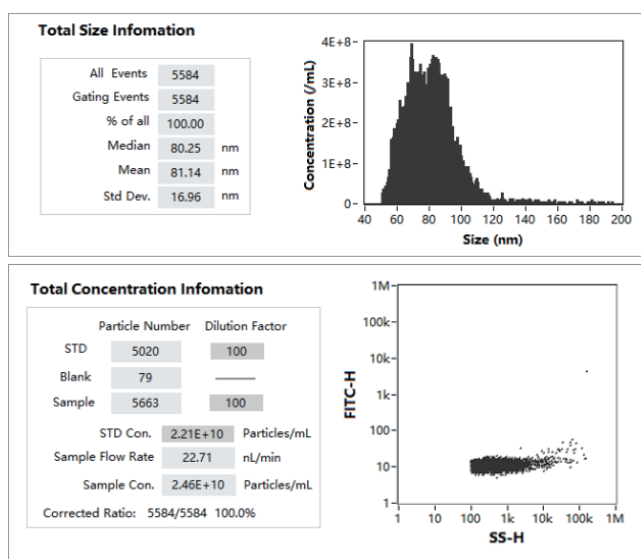


图2.Magneti-G外泌体纯化试剂盒纯化外泌体的纳米流式检测



将洗脱的外泌体进行纳米流式检测,从图 2 中可以看出,1ml 磁珠可以纯化出  $2.46 \times 10^{10}$  particles/ml 的 EVs,从粒径分布来看主要集中在 80nm 左右,符合外泌体的特征。

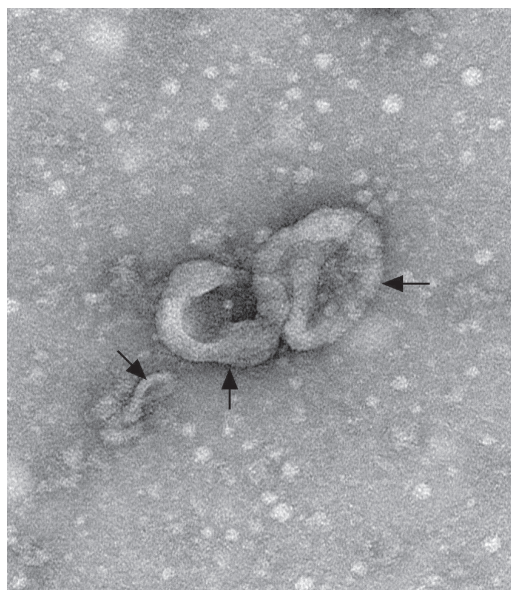


图3.Magneti-G外泌体纯化试剂盒纯化外泌体的的电镜检测

将洗脱的外泌体进行电镜负染色,从图 3 中可以看出,电镜下负染 exosome 显示为 80 nm 左右的茶杯状膜泡,形态完整,较小的脂质颗粒在电镜下也常会被观察。

## 5. 常见问题与解答

### 5.1 如何快速鉴定纯化后的产物是否含有外泌体?

- 1) 直接裂解洗脱样本,通过吸光值、BCA 或者 Bradford 检测下蛋白浓度,通常外泌体的获取量和蛋白浓度呈现正相关;
- 2) 外泌体检测最直接的方式是仍然是 WB 检测,外泌体的几个特征性标志物 CD9、CD63、CD81、TSG101 和 HSP70 等,通常 WB 选用 2-3 个特异性蛋白进行 WB 检测可初步判断样品中是否含有外泌体。

### 5.2 为何洗脱后的样本中不含有外泌体或含量低于正常值?

- 1) 可能是样本中所产生的外泌体较少,适当扩大预处理的样本容量,并排除培养过程中因活率过低或其它原因导致的外泌体污染;
- 2) 虽然看不见但可以结合下游实际需求进一步分析,可组合其它的检测方法如 WB、纳米流式等进行辅助验证;
- 3) 在实际提取分离过程中是否严格按照说明书要求进行分离纯化,排除是否因操作不当造成样本的流失;
- 4) 根据所提取样本的特性而定,提取本试剂盒推荐来源以外的外泌体时,并不能够保证提取效率与从 293 细胞培养基上清中提取效率相当,但仍需尽可能保证 4°C 的条件下进行,排除外泌体降解的可能以及样本来源差异。

### 5.3 如何长时间保存外泌体洗脱液?

- 1) 外泌体会降解不推荐长时间保存,如果不得以需要长期储存,建议在 -20°C 或 -80°C 下保存最长不超过 30 天,若在 4°C 下储存最长不超过 7 天;
- 2) 注意分装,避免反复冻融。

### 5.4 外泌体分离方法哪种方式最好?

- 1) 没有最好的方法,主要根据实验需求而定,本款试剂盒的最大特点就是比传统的超速离心法更快,且对设备的依赖性更低;
- 2) 有条件的情况下可以尝试多种方式组合提取。



## 6. 试剂盒组成

试剂盒成分	规格 /5T	规格 /50T
Magneti-G Exosome Affinity Beads	5ml	50ml
Exosome-Wash Buffer	25ml×2	500ml
Exosome-Binding Buffer	15ml	150ml
Exosome-Elution Buffer	10ml	100ml
说明书	1 份	

## 7. 订购信息

名称	货号	规格
Magneti-G 外泌体亲和纯化试剂盒	BK0046-01	5T
	BK0046-02	50T

## 8. 相关产品

名称	货号
外泌体快速纯化试剂盒	BK0047
Anti-CD19 mAb	BP0066