

大型真菌囊泡提取纯化试剂盒

产品编号	产品名称	包装规格
NW3228-2T	大型真菌囊泡提取纯化试剂盒	2T
NW3228-20T	大型真菌囊泡提取纯化试剂盒	20T

产品简介:

大型真菌囊泡在免疫调节、抗肿瘤及神经修复等治疗中具有重要作用，但其提取面临子实体组织成分复杂（如多糖、核苷类等干扰物）和细胞壁结构致密的技术瓶颈，导致囊泡提取得率低、纯度不足。

本试剂盒专为大型真菌设计，可高效释放真菌子实体组织中的囊泡，并去除子实体组织中的非囊泡成分，获得的大型真菌囊泡可用于电镜分析、NTA 粒径分析、核酸分析、蛋白分析、细胞学实验和动物实验等。

保存条件:

Solution A -80℃保存，有效期 1 年，使用前 4℃化冻，分装使用避免反复冻融；

其他组分常温运输保存，有效期 1 年。

产品组成:

组分名称	NW3228-2T	NW3228-20T
Solution A	250 µL	2.5 mL
Solution B	6.5 mL	65 mL
1%柠檬酸	2.5 mL	25 mL
1M NaOH	5 mL	50 mL
1 µm 滤膜	2T	20T
0.45 µm 滤膜	2T	20T
Exosome Purification Filter*	2T	20T

* Nuclease-free, Sterile

自备材料:

一、实验材料/耗材

- 1、削皮刀、水果刀、玻璃砧板等（可以把待提取大型真菌处理成方便榨汁的小块的用具）；
- 2、400 mL 烧杯 1~2 个；
- 3、50 mL 离心管、1.5mL EP 管若干；
- 4、pH 试纸，1~10（广泛），5.5~8.5（精密）。

二、实验设备

电子秤；碾磨榨汁机（推荐使用，可搜索原汁机购买）；4℃高速离心机；水浴锅；涡旋振荡器。

三、实验试剂

1×PBS 溶液（无菌）

产品使用：

一、榨汁前准备

- 1、榨汁机消毒：将榨汁机各部件拆分开，喷洒 75%酒精仔细擦拭后，放入生物安全柜紫外消毒至少 20 min；
- 2、样品准备：按照试剂盒处理量准备待提取样品；

注：试剂盒处理量

规格	大型真菌汁液（加 PBS 处理后）处理量
2 T	20ml
20 T	200ml

- 3、样品处理：将新鲜的待提取大型真菌洗净外表皮后，用无尘布擦干，放入生物安全柜紫外消毒至少 20 min 后，将真菌子实体切成方便榨汁的薄片；

注：一般药用大型真菌含水量很少，榨汁阶段无法出汁，所以尽量将真菌子实体组织处理成尽可能小的薄片。

二、榨汁取渣

- 1、榨汁机准备：在生物安全柜下，将完成消毒的榨汁机 部件按照榨汁机说明书组装；
- 2、榨汁取渣：将处理好的真菌子实体小片投入榨汁机榨汁，注意少量多次，收集出渣口碾磨粉碎后的真菌渣；

注：a. 如需控制内毒素，榨汁取渣过程请在生物安全柜内进行；b. 如果收集到的真菌渣中仍有未粉碎完全的子实体组织，建议将收集到的真菌渣重新榨汁粉碎。

- 3、真菌渣分散：向收集好的真菌渣中加 PBS，边加边搅拌混匀，直至真菌碎渣完全分散在 PBS 中，且混匀后的液体有良好的流动性；

注：a. 如需控制内毒素，榨汁取渣、真菌渣分散过程请在生物安全柜内进行； b. 分散所加

的 PBS 体积需要根据真菌渣释放出内容物的粘稠程度而定，可以少量多次加，及时搅拌观察液体状态。

三、提取囊泡

1、汁液预处理：在分散好的真菌渣液体中加入混匀的 Solution A 试剂，添加剂量如下（其他剂量可按添加比例换算）：

样品名称	样品剂量	Solution A 剂量
PBS 分散好的 真菌渣液体	20 mL	200 μ L
	40 mL	400 μ L

注：Solution A 试剂使用前需混匀。

2、混合孵育：加入 Solution A 试剂后盖好管盖，颠倒混匀 8~10 次，将混合液 37°C 水浴 16 h 左右（过夜）；

3、调 pH：将孵育好的混合液取出，在生物安全柜下用试剂盒自带的 1M NaOH 和 1% 柠檬酸将混合液 pH 调至 7.0；

4、低速离心去杂：将调 pH 后的液体于 4°C，5,000 \times g，10 min 离心，收集上清；

5、高速离心去杂：将低速去杂后的上清 4°C，10,000 \times g，20 min 离心后再次收集上清；

6、过滤：将上步收集得到的上清依次经 1 μ m 滤膜和 0.45 μ m 滤膜过滤；

注：如需获得 30-1000 nm 大型真菌囊泡，可只进行 1 μ m 滤膜过滤，不进行 0.45 μ m 滤膜过滤。

7、加提取试剂：取上步离心上清液加入 Solution B 试剂，添加剂量如下（其他剂量请等比例换算）：

样品名称	样品剂量	Solution B 剂量
离心过膜后的 上清液	20 mL	5 mL
	40 mL	10 mL

8、二次混合孵育：加入 Solution B 后拧紧管盖，通过涡旋振荡器混匀 1 min，将混合液 4°C 静置 4 h 左右；

9、沉淀大型真菌囊泡：取孵育好的混合液于 4°C，10,000 \times g，60 min 离心，弃上清，将含有沉淀的离心管再次于 4°C，10,000 g，2 min 离心后，吸尽上清；

注：沉淀中富含大型真菌囊泡，需尽可能吸尽上清液。

10、大型真菌囊泡重悬：取合适量的 1 \times PBS 均匀吹打离心沉淀，待其溶解后，将重悬液转移至新的 1.5 mL EP 管中（建议每 20 mL 汁液用 400 μ L 左右 1 \times PBS 重悬）；

11、大型真菌囊泡收获：将含有重悬液的 1.5 mL EP 管于 4℃, 12,000 ×g 离心 2 min, 保留上清液, 其中富含大型真菌囊泡颗粒;

注: 若沉淀较多, 可 12,000 ×g, 2 min 离心多次至无明显沉淀, 每次取上清。

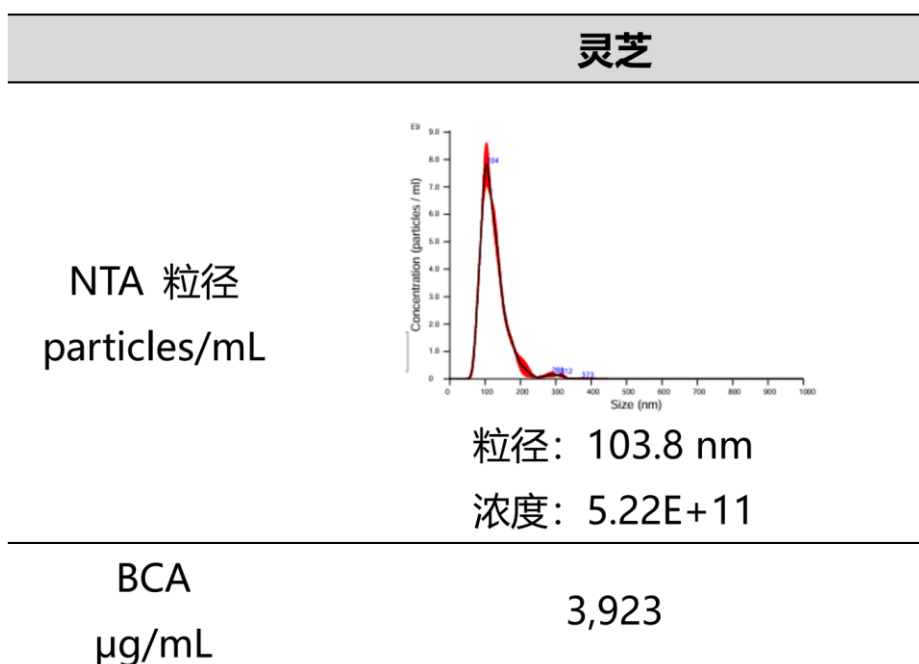
四、纯化和保存大型真菌囊泡

1、囊泡纯化: 将收获的大型真菌囊泡颗粒粗品转入 Exosome Purification Filter (EPF 柱) 上室中, 于 4℃ 以 3,000 ×g 离心 10 min, 离心后收集 EPF 柱管底的液体, 此液体即为纯化后的大型真菌囊泡颗粒;

注: a. EPF 柱不可重复使用; b. 如需获得大颗粒囊泡, 可不进行该步骤。

2、囊泡保存: 纯化后的大型真菌囊泡以合适体积进行分装冻存于-80℃低温冰箱中, 以备后续实验使用。

结果展示:



粒径及 BCA 结果展示

注意事项:

1. 试剂盒内的 Solution A 溶液, 可以按照单次使用量分装, 保存在-80℃, 使用前 4℃解冻, 解冻后尽快用完, 禁止反复冻融。
2. Solution A 试剂静置有棕黄色沉淀, 属于正常现象, 使用前需混匀。
3. 若对内毒素有严格要求, 榨汁步骤请严格在生物安全柜下进行, 关键用品和仪器注意消毒后使用。
4. 纯化后的大型真菌囊泡可保存在-80℃冰箱中, 避免反复冻融导致囊泡破裂。
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究, 不得用于医学诊断及其他用途!