

细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法)

产品简介:

Proandy 生产的细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法) (Exosome Isolation Kit from Cell Culture Media by Precipitation Method), 也称为细胞培养液上清外泌体提取试剂盒、外泌体纯化试剂盒、外泌体抽提试剂盒、Total Exosome Isolation Kit, 是一种高效、便捷的用于细胞培养液上清中外泌体或其它细胞外囊泡提取的试剂盒, 仅需简单的较低速度离心即可从样品中分离出大量完整的、纯度较高的外泌体。使用本试剂盒提取的外泌体可用于蛋白分析、核酸分析、Western blot、PCR、RNA 提取、高通量测序、外泌体粒径和浓度分析即纳米颗粒示踪分析(Nanoparticle tracking analysis, NTA)、电镜分析、细胞共培养等实验。

外泌体(Exosome)是膜包裹的细胞外囊泡(Extracellular vesicles, EVs), 直径约为 40-160nm, 具有脂质双分子层结构, 天然存在于血液、尿液、脑脊液, 以及体外培养细胞的上清液中, 几乎所有类型的细胞都可以产生并释放外泌体。细胞膜内吞(Endocytosis)依次形成初级内体(Early sorting endosome, ESE)、次级内体(Late sorting endosome, LSE)和多囊泡体(Multivesicular body, MVB), 其中多囊泡体包含腔内囊泡(Intraluminal vesicles, ILVs)。多囊泡体与细胞膜融合形成外泌体, 外泌体携带多种来自其母体细胞的成分(包括核酸、蛋白质、脂类、糖类和代谢物等)释放到胞外基质中。外泌体可以被附近或远距离的细胞识别和融合, 是细胞间进行相互调控的重要媒介, 参与了癌症、神经退行性病变和炎症性疾病等多种疾病的发病过程, 影响细胞多方面的功能。

本产品采用多聚物沉淀法, 设备要求低、操作方便、提取时间短、样品起始量低、提取效率高、外泌体形态比较完整。

本产品无 RNA 酶、无 DNA 酶、无蛋白酶。使用本产品提取得到的外泌体可以用于 RNA、DNA 及蛋白的各种应用。

按使用说明操作, 每次提取 1ml 样品需 190 μ l 的细胞上清外泌体提取试剂, 本品 10ML 试剂盒可使用约 50 次, 本品 50ML 试剂盒可使用约 250 次。

使用说明:

1. 样品的准备。

A. 在适当的条件下培养所需细胞, 当细胞密度达 70%-80%时(处于对数生长期), 加入不含外泌体的血清培养液或适当的无血清培养液, 继续培养 12-24 小时, 待细胞密度达 90%-100%时, 收集细胞上清。 **注 1:** 由于血清中含有非常多的外泌体, 为了避免污染, 此时需要加入不含外泌体的血清。不含外泌体的血清可以通过超速离心法获得, 也可以直接使用无外泌体的血清。也可以根据具体的实验条件, 使用不含血清的培养液进行培养, 某些细胞可无血清正常生长约 12 个小时, 或者增加不含细胞的培养液组作为阴性对照。 **注 2:** 细胞上清中外泌体的量随细胞类型、细胞状态和细胞数量的差别而有一定的差异, 须根据实验需求决定样品的起始量。 **注 3:** 细胞凋亡、死亡过程中会释放大量囊泡, 这些囊泡在外泌体的提取纯化过程中会污染活细胞产生的外泌体, 请确保细胞状态良好, 凋亡或死亡细胞占比尽量不超过 5%。



B. 将收集的细胞培养液在 4°C, 500×g 离心 5 分钟, 轻轻缓慢地吸取上清液至一新的离心管中; 再将上清液在 4°C, 10,000–16,500 ×g 离心 30 分钟, 轻轻缓慢地吸取上清液至一新的离心管中。

C. 用 0.22μm 的针头滤器 (FF342/FF362/FF372) 过滤上清液, 进一步去掉较大的细胞囊泡和凋亡小体等杂质, 将过滤后的上清液 转移至新的离心管中。

D. 选做: 使用 10–100kDa 之间的超滤管 (如 FUF158) 对上清液进行浓缩。将浓缩后的上清液从超滤管的死体积收集器中取出, 用于后续外泌体提取。 **注:** 一些细胞 (干细胞、神经细胞) 分泌的外泌体较少, 可以将细胞上清液体积浓缩 10 倍左右再进行后续的外泌体提取; 而对于外泌体分泌量多的肿瘤细胞等, 可以不进行浓缩或将细胞上清液体积浓缩 2–5 倍左右在进行后续的外泌体提取。具体浓缩倍数 可根据实际情况进行调整。

2. 外泌体提取。

A. 每 1ml 步骤 1 中准备好的上清液样品中加入 190μl 细胞上清外泌体提取试剂, 吹打混匀后置于 4°C, 静置 4 小时或者过夜。 **注:** 外泌体提取试剂非常粘稠, 需缓慢吸取, 缓慢加入, 并确保外泌体提取试剂与细胞上清液充分混匀。如果细胞分泌的外泌体较少, 则可以通过增加静置的时间以提高外泌体得率。

B. 10,000×g 在 4°C 离心 30 分钟, 用 1ml 吸头小心吸除上清液, 尽可能吸净上清液但不要触碰沉淀, 收集沉淀, 即为外泌体。 **注:** 细胞培养液样品中外泌体一般含量较少, 此时可能肉眼观察不到沉淀, 如果离心时使用角转子, 注意标记离心管摆放方向, 并在底部位置画圈标识。

C. 离心获得的外泌体沉淀可用适量的 PBS 或者生理盐水重悬, 一般 10ml 细胞培养液的起始量使用 0.1–1ml 重悬液进行重悬; 也可直接将沉淀用于后续实验。 **注:** 外泌体可在 4°C 保存 1 周, 或在 –20°C 及更低温度长期保存。

D. 选做: 某些样品中的非外泌体杂质较多, 导致沉淀比较多, 此时可通过重悬并短暂离心去除杂质。将沉淀用适量的 PBS 重悬, 然后 12,000×g 在 4°C 离心 2 分钟, 取上清。若沉淀较多, 可将上清多次 12,000×g 在 4°C 离心 2 分钟, 直至无明显沉淀。 **注 1:** 沉淀可能较难重悬, 需反复多次吹打。 **注 2:** 需根据后续的纯化方法选择合适的重悬液。

3. 外泌体纯化(可选)。

A. 获得的外泌体可通过外泌体纯化柱或亲和层析法等方法进一步进行纯化。

B. 若需要获得无菌的外泌体, 则可使用 0.22μm 的针头滤器进行过滤。为减少损失, 请先将滤器用 PBS 进行润洗。若提取的外泌体暂时不使用, 可进行分装后于 –80°C 保存。

注意事项:

1---本产品较为粘稠, 使用时需完全混合均匀后再吸取, 并保证吸取体积准确。

2---本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。

3---为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件:

4°C 保存, 一年有效。室温保存, 一个月有效。–20°C 保存, 至少两年有效。

