

Exosome Isolation Kit (from cell culture media, for NTA/TEM) 说明书 Cat.No. :EZB-exo201

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读本说明书，以保证操作正确

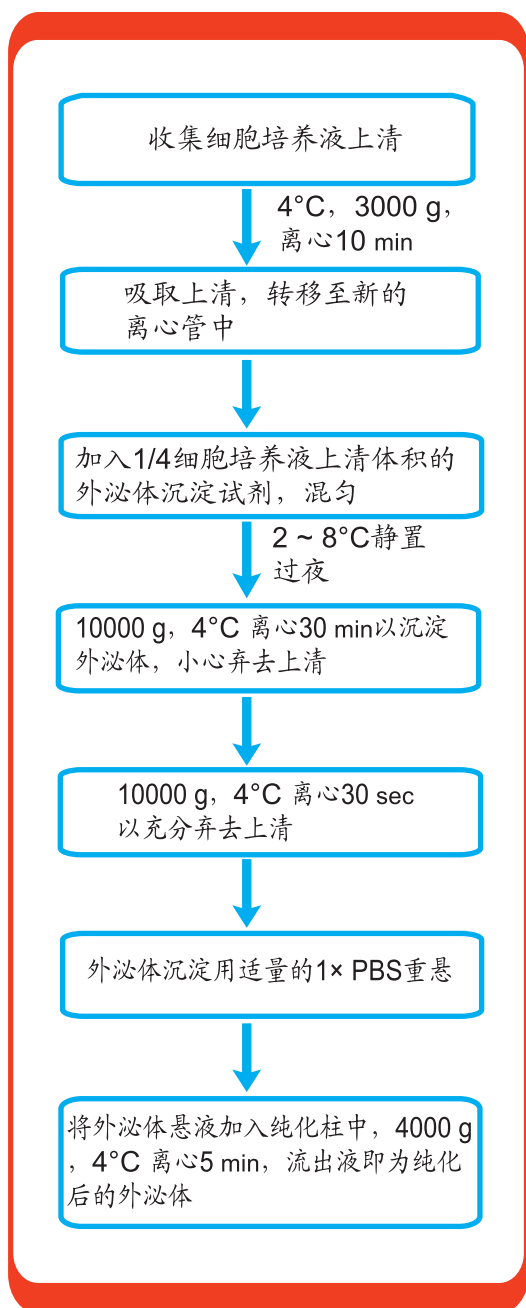
产品组分

组分	EZB-exo201-S	EZB-exo201-L
Exosome Precipitation Reagent (EPR)	50 ml	100 ml
Purification Column	10 preps	20 preps

保存条件

外泌体沉淀试剂 (EPR) 建议置于2~8°C保存, Purification Column置于室温保存。

实验流程



注意

1. 此试剂盒可用于提取细胞培养液上清样本中的外泌体，还适用于尿液、肺泡灌洗液、脑脊液等体液样品；提取的外泌体主要用于电镜和粒径分析，也可用于核酸检测。
2. 收集细胞培养液上清进行外泌体提取时，需注意，细胞应培养在不含外泌体的血清培养基或者新鲜的不含血清的培养基。
3. 起始的细胞上清用量可以在5 ml ~ 20 ml之间调整。
4. Exosome Precipitation Reagent (EPR) 从4°C冰箱取出后需在30°C水浴锅中放置30 min，充分混匀后再使用。

收集细胞培养液上清

1. 细胞在含血清的培养基中培养一段时间：
 - a) 对于贴壁细胞来说，当细胞密度达到60%左右时，将原来含血清的培养基，换成新鲜的不含血清的培养基或者不含外泌体的血清培养基继续培养。当细胞的密度达到90%左右时收取上清；
 - b) 对于悬浮细胞来说，当细胞的密度达到60%左右时，4°C, 300 g, 离心10 min收集细胞，使用新鲜的不含血清的培养基或者不含外泌体的血清培养基悬浮细胞，并继续培养。当细胞的密度达到90%左右时收取细胞及培养液混合物4°C, 300 g, 离心10 min，缓慢吸取上清；
 - c) 对于冻存的细胞培养液上清样品，须置于25°C ~ 37°C水浴中彻底融化后放置在冰上或4°C备用。

2. 收集到的细胞培养液上清4°C, 3000 g, 离心10 min。小心地吸取上清，转移至新的离心管，注意不要吸到沉淀。

分离外泌体

3. 向上述离心得到的上清液中，加入相当于1/4细胞培养液上清体积的Exosome Precipitation Reagent (EPR)。

例如：

细胞培养液上清体积	加入 EPR 体积
5 ml	1.25 ml
20 ml	5 ml

4. 震荡或上下颠倒混匀，至样品呈完全均一状态。2~8°C静置过夜。
5. 将上述静置过夜的样品4°C, 10000 g, 离心30 min (放置离心管时建议在离心管的最外侧做标记，以免因为沉淀量少肉眼不可见而无法确定沉淀位置)。小心地吸取上清液弃去，得到外泌体沉淀。
6. 4°C, 10000 g, 离心30 sec, 将残余的少量液体收集到管底。小心地吸净上清，不要吸到沉淀 (此步为可选操作)。

重悬外泌体

7. 将离心获得的外泌体沉淀用适量的1× PBS重悬。如1 ml的细胞培养液上清用20 µl的1× PBS重悬。

纯化外泌体

8. 将外泌体悬液加入纯化柱中，4000 g, 4°C 离心5 min, 流出液即为纯化后的外泌体。可以将外泌体分装为50 µl每份，可在2~8°C保存1周，或在-80°C长期保存。在电镜和粒径检测时建议将外泌体稀释5~10倍。

Exosome Isolation Kit (from cell culture media, for NTA/TEM) Trouble Shooting

1、提取细胞培养上清样品中的外泌体时有什么需要特别注意的地方吗？

a. 细胞培养上清的收集：由于常规胎牛血清（FBS）中含有大量的牛源外泌体，因此建议在细胞培养至密度达到60%以上时，更换为无血清基础培养基（如DMEM等）或采用不含外泌体的血清培养。更换培养基时，建议用PBS轻轻洗涤细胞一次，以充分去除胎牛血清。更换为无血清培养基后，约12 h后收集上清，用于外泌体提取。

b. 细胞上清液的用量：具体的细胞上清用量需要根据不同细胞种类做适当的优化调整。对于常规的肿瘤细胞等，如果后续实验用于RT-qPCR，通常建议每个细胞培养上清用量为5~20 ml（尿液、肺泡灌洗液、脑脊液等样品建议用量与细胞上清液相当）；如果后续用于提取RNA测序等，建议每个上清样品使用20 ml以上。

c. 标记沉淀位置：如果使用固定角度转子进行离心时，建议在离心管的最外侧做标记，离心结束后即可很容易确定沉淀就在标记的正下方，以免因为沉淀过少无法用肉眼看到，而无法确定外泌体沉淀位置。

2、用本试剂盒提取的外泌体能用于哪些实验？

由于本试剂盒采用了独特的纯化技术，在外泌体沉淀后，使用特制的离心过滤装置对外泌体进行了纯化，因此使用本试剂盒提取的外泌体，可以用于以下多种实验：

RNA提取（及后续的RT-qPCR、测序、芯片检测），蛋白质提取及检测，蛋白质组学检测，电子显微镜成像分析，粒径分析（NTA）等，也可用于外泌体与细胞共培养等实验。

若用于RNA提取及后续相关实验（如RT-qPCR、测序、芯片检测等），建议采用本公司配套的EZ-press Exosome RNA Purification Kit（Cat. No.: EZB-exo-RN1）进行提取，能得到高产量及纯度的RNA，且对于不同批次的样品结果更稳定。