

外泌体提取纯化试剂盒（细胞上清）

常见问题解答

上海宇玫博生物科技有限公司

推动转化医学，服务人类健康

目录

1、外泌体提取纯化试剂盒如何保存？	3
2、外泌体提取纯化试剂盒能否分离纯化200-1000nm直径的囊泡吗？	3
3、本试剂盒适用于哪些种类样品中的外泌体提取？	3
4、本试剂盒提取过程会用到哪些仪器和耗材？	3
5、样品在提取外泌体之前是否可以低温保存？	3
6、培养细胞时，如何去除血清来源的外泌体？	3
7、无外泌体血清（或者外泌体专用培养基）在什么时候使用？	4
8、细胞培养过程中的死细胞是否会影响外泌体的提取？	4
9、准备做细胞外泌体Small RNA的NGS测序，初始样品量需要准备多少？	4
10、加了ECS液离心之后无沉淀，这个现象正常吗？	5
11、在纯化过程中，EPF柱为什么会出现堵塞现象？	5
12、EPF 柱是否可以多次使用？	5
13、外泌体如何保存？	5
14、如何鉴定提取的外泌体？	5
15、提取的外泌体进行Western Blot前是否需要加入RIPA试剂裂解？	6
16、进行外泌体Western blot鉴定时，有无内参蛋白可供选择？	6
17、组织细胞外泌体如何提取？	6

1、外泌体提取纯化试剂盒如何保存？

室温保存，无需低温保存。

2、外泌体提取纯化试剂盒能否分离纯化200-1000nm直径的囊泡吗？

不能，本试剂盒不能用于直径大于200nm囊泡的分离。

3、本试剂盒适用于哪些种类样品中的外泌体提取？

除细胞上清液外，本试剂盒还可用于尿液及其他低密度体液（如脑脊液、腹水、羊水、胸腔积液、唾液等）的外泌体提取。

4、本试剂盒提取过程会用到哪些仪器和耗材？

低温高速离心机、涡旋振荡器（Vortex）、水浴锅、移液器、离心管（1.5mL、50mL）。

5、样品在提取外泌体之前是否可以低温保存？

可以。长期保存请放置于-80℃，无须加冻存液；短期保存（1-2天内）则放置于4℃即可。

6、培养细胞时，如何去除血清来源的外泌体？

多数情况下，细胞在体外培养时需要血清，而血清中一般都含有外泌体，为避免血清对细胞外泌体的污染，可采用以下两种方法：

- (1) 将细胞培养用的血清通过 $1 \times 10^5 g$ 超速离心 10h以上以去除血清外泌体；
- (2) 选择无血清完全替代培养基进行细胞培养。《外泌体专用培养基 UR51102》

7、无外泌体血清（或者外泌体专用培养基）在什么时候使用？

- 无外泌体血清培养基：

细胞在正常含血清的培养基中培养一定的时间后，细胞汇合度约为60%-70%时，移去原有含血清的培养基，换成新鲜的无外泌体血清培养基，继续培养24-48h，细胞汇合度达到80%-95%左右时收取上清，该上清液即可用于提取外泌体。

- 外泌体专用培养基：

- 阶段培养一：待细胞汇合度约为 50%时，移去原有完全培养基，添加新培养基（50%外泌体专用无血清培养基+50%完全培养基）；
- 阶段培养二：待细胞在梯度培养一中生长汇合度约为 70-80%时，移去原有的 50%外泌体专用无血清培养基+50%完全培养基；
- 使用 1X PBS 溶液将细胞润洗 2-3 次；
- 加入外泌体专用无血清培养基继续培养24-48h，待细胞汇合度到90%-100%时收取细胞培养上清液，该上清液即可用于外泌体提取实验。

8、细胞培养过程中的死细胞是否会影响外泌体的提取？

会的。在收获细胞时，应确定死亡细胞占比不超过5%。细胞凋亡/死亡过程中会释放大量囊泡，它们在外泌体的提取纯化过程中会污染活细胞产生的外泌体，同时有可能会堵塞EPF纯化柱。

9、准备做细胞外泌体Small RNA的NGS测序，初始样品量需要准备多少？

普通肿瘤细胞系推荐使用50mL以上的初始样品量。由于某些细胞（如悬浮细胞、干细胞、神经细胞等）中外泌体含量比较低，建议先通过10kD超滤柱浓缩（超滤柱上层液体即为浓缩后的样品），

准备50mL以上的浓缩液再使用本试剂盒提取外泌体。

10、加了ECS液离心之后无沉淀，这个现象正常吗？

由于某些细胞（如悬浮细胞、干细胞、神经细胞等）中外泌体含量比较低，加了ECS液离心之后肉眼可能无法观察到沉淀，在重悬时使用PBS朝离心管离心外侧的内壁反复吹打洗脱即可（避免剧烈吹打）。针对提取后的外泌体先进行NTA粒径检测或BCA蛋白定量检测，再决定是否进行后继实验。

11、在纯化过程中，EPF柱为什么会出现堵塞现象？

- 该现象有可能是因为细胞培养时间过长产生很多细胞碎片(样品离心预处理时不充分,仍有杂质残留。若杂质残留较多, 请将上清液转移至新离心管, 10000g/20min离心2-3次至无明显沉淀, 每次离心收集上清液, 建议细胞培养24-48h左右收集上清液。
- PBS重悬的外泌体初始液12000g/2 min离心2-3次至无明显沉淀, 每次离心收集上清液, 上清液再进行EPF柱纯化。

12、EPF柱是否可以多次使用？

不能重复使用。过量的样品会超出纯化柱的使用极限，影响分离效果。

13、外泌体如何保存？

纯化后的外泌体可于4℃保存不超过一周，-80℃条件下可长期保存。

14、如何鉴定提取的外泌体？

通常使用透射电镜检测(形态)、粒径检测(大小)、Western blot检测等方法鉴定提取的外泌体。

在进行Western Blot检测时，通常检测外泌体标志蛋白（CD63、CD9、CD81、TSG101等）。

《UR52301 外泌体CD63&TSG101蛋白检测试剂盒》

15、提取的外泌体进行Western Blot前是否需要加入RIPA试剂裂解？

需要，一般按照1:1的比例加入强IPA试剂，或使用《UR33101外泌体专用裂解缓冲液》。

16、进行外泌体Western blot鉴定时有无内参蛋白可供选择？

无，该检测属于定性检测。

17、组织细胞外泌体如何提取？

无菌环境下将组织剪成小块（越小越好），然后在无血清的培养基中培养12h；将培养液转移至离心管中，于4℃以3000g离心20 min去除培养液中杂质和细胞碎片，将上清液转移至新的离心管中；先使用0.45μm滤器过滤上清液，接着使用0.22μm滤器过滤上清液，再按照本试剂盒说明书提取外泌体。