

Exosome Isolation Kit (from Cell Culture Media)

常见问题回答

1、本试剂盒如何保存？

室温保存，无需低温保存。

2、本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、乳汁、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。长期请保存于-80℃，无须加冻存液；短期（1-2 天内）则保存于 4℃ 即可。

6、粘度过大的样品如何处理？

如果样品粘度过大时（因细胞分泌物较多所致），可将样品用 1×PBS 缓冲液进行等体积稀释，混匀稀释后的样品再使用本试剂盒提取外泌体。

7、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 以去除血清外泌体；
- （2）选择无血清培养基进行细胞培养。

8、无外泌体血清培养基（或者无血清培养基）在什么时候使用？

细胞在正常含血清的培养基中培养一定的时间后，细胞融合度约为 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（或者无血清培养基），继续培养 24-48h，细胞融合度达到 80%-95%左右时收取上清，该上清液即可用于提取外泌体。

9、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大小不等的囊泡，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。

10、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 40mL 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，准备 40mL 以上的浓缩液再使用本试剂盒提取外泌体。

11、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 液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。

12、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，仍有细胞碎片残留），建议细胞培养 24-48h 左右收集上清液。

13、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。

14、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。

15、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）。

16、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 RIPA 试剂。

17、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。

18、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 0.45 μm 滤器过滤上清液，接着使用 0.2 μm 滤器过滤上清液，再按照本试剂盒说明书提取外泌体。