

产品介绍

外泌体（Exosome）是细胞外囊泡（Extracellular Vesicles, EVs）的一种，是由脂质双分子层包裹的微小囊泡，直径一般为30-150nm。外泌体的膜主要由脂质和蛋白质组成，其内容物中除蛋白质外还发现了多种核酸，包括DNA、mRNA、microRNA和lncRNA等。外泌体能够将核酸、蛋白质和脂质在内的多种生物活性分子从供体细胞转移到受体细胞，介导细胞间通讯和分子转运，被称为细胞间信使。外泌体可以由所有类型的活细胞分泌，同时广泛分布于血液、尿液、唾液、乳汁、胆汁等各种体液中。因此，外泌体在生理病理标志物和药物递送方面有巨大的应用潜力。

外泌体功能和运输的生物学研究需要分离完整的外泌体，目前常用的外泌体富集方式是利用过滤和超高速离心方法，但实验步骤繁琐、仪器设备昂贵。Proteintech外泌体分离及蛋白提取试剂盒提供了一种简单可靠的方法，可从细胞培养上清或尿液中富集完整的外泌体，后续可用于NTA粒径分析，Western Blot，免疫沉淀（IP），核酸提取及Q-PCR，测序等分析。

关于试剂盒

●本试剂盒目前只适用于新鲜的或-80℃冷冻保存的**细胞培养上清或尿液**中分离外泌体，但样品越新鲜分离效果越好，得率越高。

●为了确保从细胞培养上清中分离的外泌体是来源于细胞而非胎牛血清，可使用去除外泌体的胎牛血清培养细胞，或使用无血清培养基培养细胞。

●外泌体裂解液在使用前需加入蛋白酶抑制剂混合物，外泌体分离液在使用时不需要加入蛋白酶抑制剂混合物。

●建议样品体积至少为1mL，当样本体积为1mL时，本试剂盒可以处理40个样品。

●不同发育阶段、不同生长条件、是否病变、不同储存条件的样品都会直接影响最终外泌体的得率。

●本产品只用于科学研究，不能用于临床诊断。

●试剂盒过期后建议不要使用。

产品成分

组分	规格	保存条件
外泌体分离液	20 mL	-20℃
外泌体裂解液	10 mL	-20℃
SDS-PAGE蛋白上样缓冲液（4X）	2 mL	-20℃
普通型蛋白酶抑制剂混合物（100X）	0.5 mL	-20℃

包装规格

40 T

保存条件

-20℃保存，一年有效。一个月内使用可4℃保存。

使用方法

1、样品预处理

1.1 -80℃冻存样品：室温或25℃水浴解冻，将完全融化的样品置于冰上。

1.2 新鲜样品：收集样品后置于冰上。

1.3 4℃，3,000×g，离心15min，去除细胞或细胞碎片，离心后将上清吸入新管中。

2、外泌体分离

2.1 将样本转移至新的离心管中，加入0.5倍体积的外泌体分离液，上下颠倒混匀。如：初始的细胞培养上清体积为1mL，则加入0.5mL外泌体分离液。

2.2 将样品在2℃至8℃下静置孵育过夜。

2.3 孵育完成后4℃ 12,000×g，离心30min。

2.4 吸去上清，管底沉淀即为外泌体（在大多数情况下不可见），注意不要破坏外泌体沉淀。

注：（1）用固定角度的离心机离心时，要标记管子的摆放方向，在重悬时朝离心管靠外侧的内壁反复吹打混匀。

（2）步骤2.4得到的外泌体沉淀如需制备外泌体蛋白见步骤3，如需完整外泌体形态的检测如电镜形态观察、颗粒粒径测定等可直接进行外泌体的保存操作（步骤4）。

3、外泌体蛋白提取

3.1 取适量外泌体裂解液，在使用前按100:1添加蛋白酶抑制剂混合物（100×）备用。

3.2 取0.01倍初始样本体积的外泌体裂解液重悬外泌体沉淀，如：初始的细胞培养上清体积为1mL，则加入10μL外泌体裂解液重悬。

3.3 在涡旋仪上高速剧烈涡旋，涡旋10s暂停10s，如此反复操作1min，冰浴2min，重复涡旋及冰浴步骤3次，以充分抽提外泌体蛋白。

3.4 将外泌体蛋白样品放在冰上超声破碎，充分打断核酸序列。

3.5 取部分样品用来测浓度，剩下的蛋白样品按照3:1比例和SDS-PAGE蛋白上样缓冲液（4X）混合。如：剩下的蛋白

样品体积为0.3mL，则加入0.1mL SDS-PAGE蛋白上样缓冲液（4X）。100℃水浴加热5 min，以充分变性蛋白。冷却至室温后，4℃，10000 g离心5 min分离上清，分离后的上清可直接上样到SDS-PAGE胶加样孔或分成数管保存在-20℃或-80℃。

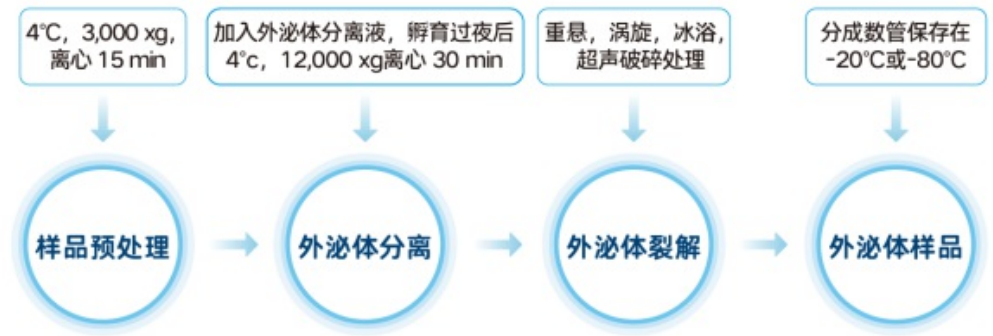
4、外泌体的保存

加入0.01倍初始样本体积的1×PBS重悬外泌体，可直接应用于下游实验（如：粒径分析，核酸提取及其Q-PCR，测序等），或者在2-8℃保存一周，-80℃保存三个月，避免反复冻融。

问题解答

问题	可能原因	解决方案
未提取到外泌体	样品不新鲜	取新鲜样本或在-80℃保存时间较短的样品提取
外泌体得率太低	样本中外泌体含量少	加大样品量
尿液中提取的外泌体蛋白质用BCA法检测值偏高	尿液中含有维生素C等类型的还原剂会干扰BCA法浓度检测	对样品进行10倍以上稀释后再检测

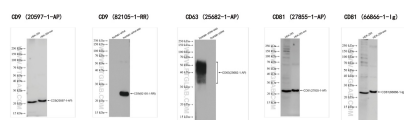
分离及蛋白提取流程



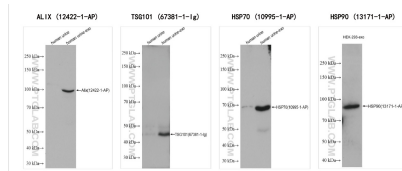
注意事项

- 1、所有步骤都需在低温下进行。
- 2、每毫升细胞培养上清，大约可得到3-6 ug左右外泌体蛋白，为了不影响后续实验，可适量加大初始样品的体积。
- 3、收集的细胞上清至少是培养了48小时以上的且细胞生长状态正常的样本。
- 4、本试剂盒不包含已灭菌的1×PBS，用户需自备。
- 5、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液中含少量DTT，有轻微刺激性气味，但不含剧毒的巯基乙醇。为取得最佳的使用效果，尽量避免过多的反复冻融，可以适当分装使用。
- 6、得到的样品蛋白可以使用Proteintech的增强型BCA蛋白浓度检测试剂盒（货号：[PK10026](#)）测定蛋白浓度，不适用Bradford法测蛋白浓度。
- 7、本试剂盒中试剂都应在室温下溶解，请勿加热。
- 8、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴好一次性手套操作。

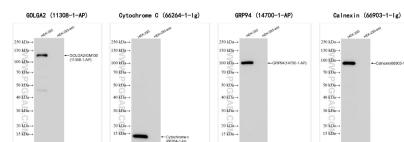
Validation Data



外泌体膜蛋白检测: 使用外泌体分离及蛋白提取试剂盒 (细胞培养上清/尿液) (货号: PK10028) 提取的 human urine-derived exosomes (human urine-exo) 和 HEK-293-derived exosomes (HEK-293-exo) 外泌体膜蛋白检测。抗体: CD9 20597-1-AP 稀释度: 1:1000; CD9 82105-1-RR 稀释度: 1:5000; CD63 25682-1-AP 稀释度: 1:1000;... CD81 27855-1-AP 稀释度: 1:2000; CD81 66866-1-Ig 稀释度: 1:8000。



外泌体内蛋白检测: 使用外泌体分离及蛋白提取试剂盒 (细胞培养上清/尿液) (货号: PK10028) 提取的 human urine-derived exosomes (human urine-exo) 和 HEK-293-derived exosomes (HEK-293-exo) 外泌体内蛋白检测。抗体: ALIX 12422-1-AP 稀释度: 1:10000; TSG101 67381-1-Ig 稀释度: 1:5000; HSP70 10995-1-AP 稀释度: 1:10000;... HSP90 13171-1-AP 稀释度: 1:10000。



外泌体阴性对照检测: 使用外泌体分离及蛋白提取试剂盒 (细胞培养上清/尿液) (货号: PK10028) 提取的 HEK-293-derived exosomes (HEK-293-exo) 外泌体阴性对照检测。抗体: GOLGA2/GM130 11308-1-AP 稀释度: 1:10000; Cytochrome c 66264-1-Ig 稀释度: 1:5000; GRP94 114700-1-AP 稀释度: 1:10000;... Calnexin 66903-1-Ig 稀释度: 1:10000。

For technical support and original validation data for this product please contact

T: 027-87531629

E: Proteintech-CN@ptglab.com

W: ptgcn.com

This product is exclusively available under Proteintech Group brand and is not available to purchase from any other manufacturer.