

## BeyoExo™增强型细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法)

产品编号	产品名称	包装
C3622S	BeyoExo™增强型细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法)	50次
C3622M	BeyoExo™增强型细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法)	250次

### 产品简介:

- 碧云天生产的BeyoExo™增强型细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法) (BeyoExo™ Enhanced 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。
- 本试剂盒的得率大幅提高。相较于普通的细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法) (C3620), 本增强型试剂盒进一步优化了配方, 大幅提高了外泌体提取效率和保存稳定性, 实测得率大多数情况下至少可以提高3倍(图2)。
- 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[1], 几乎所有类型的细胞都可以产生并释放外泌体[2]。如图1所示, 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[3]。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[4-5]。

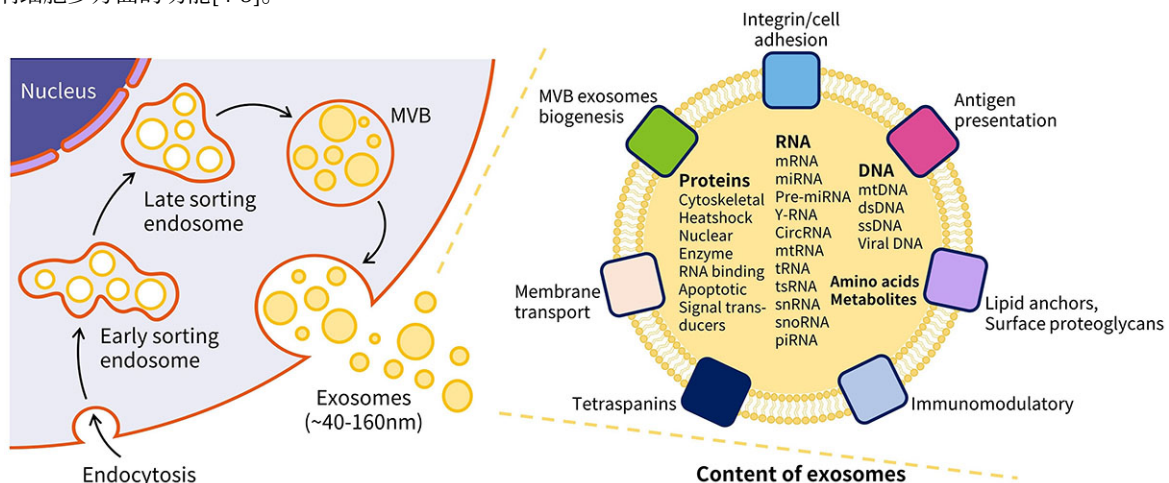


图1. 外泌体的形成原理及其携带的母体细胞成分示意图。

- 常规的细胞外囊泡提取方法有超速离心法(Ultracentrifugation/UC)、沉淀法(Precipitation)、尺寸排阻色谱法(Size-exclusion chromatography/SEC)、超滤法(Ultrafiltration/UF)、免疫亲和分离法(Immunoaffinity capture/IAC)等。各提取方法的原理、优缺点请参考下表[6]。

Methods	Separation principle	Advantages	Disadvantages
Ultracentrifugation (超速离心法)	Density; Floatation speed (in case of density gradient)	Most widely used as the Gold Standard; Robust method; Possibility to identify subpopulations when density gradient is applied.	Heavy workload; Might lead to ruptured EVs; Low EV yield; Results are difficult to compare between different studies due to different rotor types and centrifugation speeds; Large volume of starting material

			required.
Precipitation (沉淀法)	Solubility	User-friendly method; High EV yield; Many kits commercially available; Relatively cheap method; Possibility for clinical application.	High risk of co-isolating non-vesicular contaminants; Polymers may be problematic for some downstream applications; Might not be suitable for performing functional studies.
Size-exclusion chromatography (尺寸排阻色谱法)	Hydrodynamic radius	Fast and simple; EV integrity is maintained during isolation; May be used in upscaling processes.	Potentially significant contamination with non-EV particles (e.g. lipoproteins, albumin).
Ultrafiltration (超滤法)	Hydrodynamic radius	Can be very well combined with other methods; Easy to perform in every lab.	Filter type and ultrafiltration method influence EV yield and composition considerably; Rather limited resolution.
Field-flow fractionation (场流分离法)	Hydrodynamic radius; Electrophoretic mobility	Can identify smaller EV subsets (e.g. exomeres).	Specific equipment required and the associated expertise; Cannot be used as a stand-alone method.
Immunoaffinity capture (免疫亲和分离法)	Surface markers	Very pure EV isolations; Can be combined with light scattering flow cytometry; Capable of isolating subpopulations.	Currently not suitable for a complete isolation of all EVs; Expensive.
Microfluidics (微流控技术)	Surface markers; Hydrodynamic radius; Density	EV isolation can be combined with EV characterization; Subpopulations can be isolated; Small sample volumes can be used for EV isolation.	Requires a specific level of expertise; Not suitable for preparative purposes (e.g. therapeutic applications).
Membrane affinity methods (膜亲和法)	Membrane affinity	Is able to isolate all EVs instead of only EV subpopulations.	Cannot discriminate between EVs and cell(s) fragments.

- 本产品采用改良的多聚物沉淀法，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。
- 相较于普通的细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法) (C3620)，本增强型试剂盒进一步优化了配方，在外泌体分离提取过程中，可减少离心管、移液枪头等耗材材料表面的亲水性或疏水性等基团、表面电荷对外泌体产生的吸附作用，从而降低外泌体在提取过程中造成的大量损耗，提高外泌体提取率和保存稳定性。使用本产品提取的外泌体，经Western检测外泌体标志性蛋白的效果参考图2。

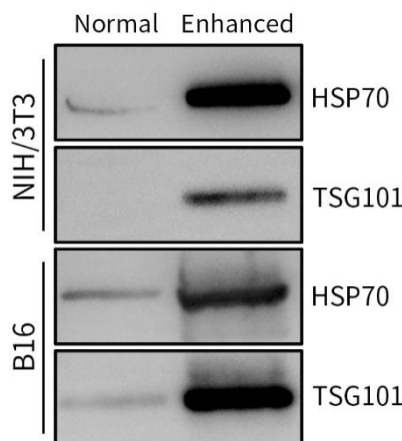


图2. 碧云天BeyoExo™增强型细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法) (C3622)提取的外泌体经Western验证的效果图。取无血清培养液培养48小时的NIH/3T3、B16细胞上清10ml，经普通的细胞上清外泌体提取试剂盒(Normal)和本试剂盒(Enhanced)提取外泌

体后，通过Western blot检测外泌体标志性蛋白HSP70和TSG101。HSP70和TSG101抗体推荐使用碧云天的BeyoExo™ Hsp70 Rabbit mAb (Exosome Validated) (AF0601)和BeyoExo™ TSG101 Rabbit mAb (Exosome Validated) (AF0608)。实际效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

- 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。
- 本产品对于大部分细胞上清而言，只需要10ml的细胞培养上清，通过沉淀2小时即可获得外泌体，相对比较省时省力。对于分泌外泌体较少的细胞，可以通过增加细胞上清体积或者增加沉淀时间来提高外泌体提取率。
- 按使用说明操作，每次提取1ml样品需190μl的BeyoExo™增强型细胞上清外泌体提取试剂，一个小包装的本试剂盒可使用约50次，一个中包装的本试剂盒可使用约250次。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
C3622S	BeyoExo™增强型细胞上清外泌体提取试剂	10ml
C3622M	BeyoExo™增强型细胞上清外泌体提取试剂	50ml
	说明书	1份

#### 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。

#### 注意事项：

- 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。
- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 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的BeyoExo™增强型细胞上清外泌体提取试剂，吹打混匀后置于4°C，静置2-4小时或者过夜。

**注：**BeyoExo™增强型细胞上清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或者增加样本量以提高外泌体得率。

- 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)。

- 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。
- 若需要获得无菌的外泌体, 则可使用0.22 $\mu$ m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 $^{\circ}$ C保存。

### 4. 外泌体裂解(可选)。

获得的外泌体重悬液或沉淀可以使用BeyoExo™外泌体专用裂解液(C3632)裂解后进行蛋白浓度测定或进行Western等后续实验。具体可参考BeyoExo™外泌体专用裂解液(C3632)的使用说明。

### 参考文献:

- Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, et al. J Biol Chem. 1991. 15;266(5):3239-45.
- Luo W, Dai Y, Chen Z, Yue X, Andrade-Powell KC, et al. Commun Biol. 2020. 10;3(1):114.
- Kalluri R, LeBleu VS. Science. 2020. 367(6478).
- He C, Zheng S, Luo Y, Wang B. Theranostics. 2018. 1;8(1):237-255.
- Zhang Y, Bi J, Huang J, Tang Y, Du S, et al. Int J Nanomedicine. 2020. 22;15:6917-6934.
- Stam J, Bartel S, Bischoff R, Wolters JC. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2021. 1169:122604.

### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
AF0601-50 $\mu$ l	BeyoExo™ HSP70 Rabbit mAb (Exosome Validated)	50 $\mu$ l
AF0605-50 $\mu$ l	BeyoExo™ CD63 Rabbit mAb (Exosome Validated)	50 $\mu$ l
AF0608-50 $\mu$ l	BeyoExo™ TSG101 Rabbit mAb (Exosome Validated)	50 $\mu$ l
AF0611-50 $\mu$ l	BeyoExo™ CD9 Rabbit mAb (Exosome Validated)	50 $\mu$ l
C0922-50ml	BeyoExo™通用型外泌体专用培养液	50ml
C0922-500ml	BeyoExo™通用型外泌体专用培养液	500ml
C3620S	细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法)	50次
C3620M	细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法)	250次
C3622S	BeyoExo™增强型细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法)	50次
C3622M	BeyoExo™增强型细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法)	250次
C3625-1ml	BeyoExo™外泌体提取增强剂	1ml
C3625-5ml	BeyoExo™外泌体提取增强剂	5ml
C3629S	BeyoExo™血清血浆外泌体提取试剂盒(沉淀法)	50次
C3629M	BeyoExo™血清血浆外泌体提取试剂盒(沉淀法)	250次
C3632-20ml	BeyoExo™外泌体专用裂解液	20ml
C3632-100ml	BeyoExo™外泌体专用裂解液	100ml
C3651S	BeyoExo™外泌体蛋白检测试剂盒	10次
C3801-100 $\mu$ g	BeyoExo™ HEK293细胞外泌体(High Purity)	100 $\mu$ g
C3803-100 $\mu$ g	BeyoExo™ HEK293细胞外泌体(High Purity, EGFP标记)	100 $\mu$ g
C3805-10mg	BeyoExo™ 牛奶外泌体(High Purity)	10mg
C3805-100mg	BeyoExo™ 牛奶外泌体(High Purity)	10mg $\times$ 10
C3805-1g	BeyoExo™ 牛奶外泌体(High Purity)	10mg $\times$ 100
S1971-0.2ml	BeyoExo™外泌体抑制剂(GW4869)	5mM $\times$ 0.2ml
S1971-5mg	BeyoExo™外泌体抑制剂(GW4869)	5mg
S1971-25mg	BeyoExo™外泌体抑制剂(GW4869)	25mg

Version 2024.07.18