

细菌发酵上清液/冲洗液外泌体提取试剂盒

EC105-01/02/03

■产品信息：

产品名称	产品编号	规格
尿液外泌体提取试剂盒	EC105-01	80ml
尿液外泌体提取试剂盒	EC105-02	200ml
尿液外泌体提取试剂盒	EC105-03	400ml

■产品介绍：

Exosomes Isolation Regents 是用于高效、快速、方便的从尿液中提取 Exosomes 的试剂盒。仅需通过简单操作和常规离心机即可从样本内中获取大量结构完整的 Exosomes。相比传统的超高速离心法，Exosomes Isolation Regent 提取效率更高，更节省时间和样本，提取的 Exosomes 可用于 WB、PCR、qPCR、NGS、细胞功能实验和 Elisa 等实验。

■试剂盒适用范围：

本试剂盒只适用于细菌发酵上清液和肠道冲洗液外泌体提取，仅用于科学研究。

试剂组分	规格	储存条件
Isolation Reagent A	20ml/50ml/100ml	4℃
Isolation Reagent B	60ml/150ml/300ml	4℃

■保存条件：

请于 4℃ 保存，可稳定保存一年。

■流程介绍：

样品预处理→沉淀外泌体→外泌体重悬。

■样品准备：

细菌发酵上清液：

- 1、收集细菌发酵上清液或肠道冲洗液，根据样本的粘稠度需要用生理盐水或无菌 PBS 进行稀释；
- 2、将培养液于 4° C，500g 离心 10min，除去残留样本中残渣；
- 3、收集上清液，2000g 离心 10min，除去残留细菌；
- 4、收集上清液，10000g 离心 10min，除去碎片；
- 5、收集上清液提取 Exosomes 或 4℃保存待用。

肠道冲洗液：

- 1、收集肠道冲洗液，于 4℃，500g 离心 10min，除去残留样本中残渣，重复 1 次；
- 2、收集上清液，2000g 离心 10min，除去残留细菌；

3、收集上清液，10000g 离心 10min，除去碎片；

4、收集上清液提取 Exosomes 或 4°C 保存待用。

注：如需进行下游核酸（DNA 或 RNA）相关实验，建议样品量不低于 10 ml。

■ **Exosomes 提取：**

1、转移上清液至新离心管中，加入体积比为 V 样:VA=2:1 的 Isolation Reagent A；

2、颠倒混匀 3-5 次后于 4° C 静置 5min，然后 10000g 离心 5min；取上清液转入新的离心管中，加入相同体积的 Isolation Reagent B ；

3、颠倒混匀 3-5 次后于 4° C 静置 1h，然后 13500g 离心 0.5 h，弃去上清液，收集沉淀，此沉淀即为外泌体；

4、根据后续实验加入 500ul 无菌 PBS 重悬沉淀物（或下游实验重悬液），进行后续实验或分装后-80°C 保存。

注意：建议起始样本量不低于 10ml，具体实际用量根据后续实验类型进行调整。

■ **常见问题：**

Q1：如何鉴定提取的外泌体？

A1：外泌体是体细胞分泌的细胞外囊泡群体中一种，直径一般为 30-150nm，通常确定外泌体一般需要三个验证：透射电镜（TEM）形态观察，颗粒粒径测定（NTA）和蛋白标志物检测（外泌体标志蛋白有 CD9，CD81，CD63，TSG101，Alix 等）。

Q2：将 Isolation Reagent 加入到体液样本中后，颠倒混合。请问这一步是否可以用振荡器剧烈震动对效果有影响？

A2：只需将 Isolation Reagent 与待提取样品混合均匀即可，震荡的强度不宜过分剧烈，剧烈震荡会破坏外泌体结构完整性，影响提取效果。

Q3：提取的外泌体可以用于转录组，代谢组学和蛋白组学研究吗？

A3：试剂盒提取的外泌体可以用于基于核酸的（DNA 或 RNA）的高通量测序分析，经我们验证 10ml 细菌培养液，20ml 的肠道冲洗液样品样品提取的外泌体可以满足 small RNA 测序需求。基于沉淀法开发的外泌体提取试剂盒不能够完全去掉杂蛋白，不建议用来做代谢组学和蛋白组学的研究。

Q4：提取的外泌体可以标记后，用于细胞或者动物实验荧光检测吗？

A4：试剂盒提取的外泌体可以用于细胞和动物实验。建议在进行细胞实验前对有效浓度进行探索性实验，且蛋白质数量或粒子数对外泌体进行定量时也存在误差。同时外泌体的标记方法和荧光浓度也需摸索。

Q5：细菌外泌体提取过程中需要注意的事项有哪些？

A5：细菌外泌体提取的样本一般为培养液和肠道或其他动物器官的冲洗液，在样本前处理过程中一定要特别重视杂志的去除，可以采用低速离心，尼龙网粗过滤（200-500 目）等方法进行处理，也可重复样品准备阶段的步骤 1 和 2。