



产品使用说明书

外泌体生物素标记和纯化试剂盒

Exsomes Biotin Labeling & Purification Kit

Cat.# **ExoPbio05-1**
 ExoPbio10-1

辽宁润基生物科技有限公司

Liaoning Rengen Biosciences Co.,Ltd.

Version 1.0

2/7/2020

目录

保存和应用	2
产品介绍	3
试剂盒组成和说明	4
操作方法	5
实验数据分析	6
相关产品信息	8
技术支持	8

保存与应用

【保存条件】

干冰或冰袋运输，收到试剂盒后按不同组分分别在 2-8℃或-20℃下保存，有效期 6 个月，使用前请仔细阅读说明书。

【应用范围】

本产品只用于科学研究，不能用于临床诊断和治疗。

产品介绍

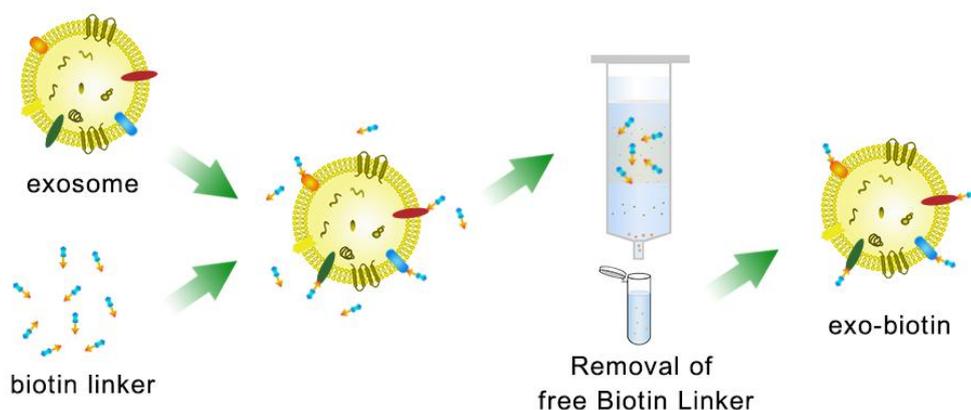
外泌体(Exosome)是由不同细胞分泌的直径 30-150nm 的胞外膜性囊泡。外泌体内容物丰富,包括蛋白质、脂质和核酸等,在细胞间信息交流中发挥着重要作用,并与多种疾病的发生、发展、治疗及预后密切相关。

作为天然的胞间信息载体,外泌体免疫原性低,生物相容性高,在人体血液中比较稳定。能够利用增强渗透滞留效应(Enhanced Permeation and Retention effect, EPR),有选择性的渗透和滞留在肿瘤或炎症组织部位,可穿透血脑屏障等。不仅可以通过其内源内容物直接对受体细胞进行治疗,也可以作为药物载体,递送化学药物、蛋白质、多肽及基因药物,在医疗领域具有巨大的应用潜力。

为了增强外泌体的治疗效果,降低对正常细胞的毒害,需提高外泌体的靶向递送能力,目前科研常用方法是基因改造分泌外泌体的细胞,利用重组克隆质粒,在细胞中表达靶向蛋白或多肽-外泌体膜蛋白复合体,收集释放的外泌体,来获得靶向外泌体,但该方法修饰效率低,且部分细胞转染困难,难以大规模制备。生物素和链霉亲和素之间具有极高的亲和能力,反应高度专一,形成复合物的解离常数很小,呈不可逆反应性,产物稳定性高,目前生物素-亲和素系统在生物领域已成为了一种通用普适的研究方法。

本试剂盒通过化学连接的方法,直接将生物素以共价键方式偶联在外泌体表面,再采用 SEC 分子排阻柱将游离的生物素去除,得到大量纯净的生物素修饰外泌体。生物素修饰的外泌体可以通过链霉亲和素,与任何带生物素标记的蛋白,多肽或小分子进行连接,实现外泌体蛋白,多肽,小分子表面修饰。

本试剂盒生物素修饰效率高,反应条件温和,生理条件下即可发生反应,反应特异性好,无有害副产物,不损伤外泌体膜结构,也不影响外泌体的生物活性和功能,可实现生物素外泌体的大规模制备。



试剂盒组成和说明

组分名称	Cat.# ExoPbio05-1	Cat.# ExoPbio10-1	保存温度
biotin linker 冻干粉	1 支	1 支 x 2	-20°C避光, 干燥
反应增强液	100μL×1 支	200μL×1 支	2-8°C
SuperEV 0.5 外泌体纯化柱 (货号: EXOSEC0.5-5)	10mL×5 支	10mL×10 支	2-8°C

注意：纯化柱内含有保存液，请竖立保存。

需自备的试剂和设备

1. 二甲基亚砷 (DMSO)
2. PBS 缓冲液 (PH 7.2-7.6)
3. 0.22um 滤膜
4. 收集管 (烧杯, 5mL, 2mL 离心管)
5. 旋转混匀仪或震荡混匀仪

【注意事项】

1. biotin linker 易水解，使用前需室温放置 10 分钟，平衡至室温，避免冷凝水凝结，使用后请立即盖好旋紧，用封口膜密封。
2. 外泌体缓冲液中避免含有 Tris、甘氨酸等带胺的物质。
3. 可以对任何来源的外泌体进行修饰，包括细胞培养液和体液(如，血清、血浆、尿液、CSF 或唾液) 提取的外泌体。
4. 不建议使用 PEG 沉淀法提取的外泌体，推荐超速离心法、亲和色谱法、SEC 分子排阻色谱法或磁珠捕获等方法提取外泌体。
5. 为达到较好的修饰效果，外泌体浓度不得低于 5×10^{10} 颗粒数/mL。
6. 本试剂盒为非无菌操作，在进行下游细胞实验或体内实验前，必须将修饰好的外泌体进行 0.22um 滤膜过滤，以达到无菌状态。
7. 本试剂盒未开封前的有效期为 6 个月，请在有效期内使用。

操作方法

一、实验前准备

1. biotin linker 冻干粉溶解

从-20℃冰箱中取出 biotin linker，室温放置 10 分钟，平衡至室温。打开封口膜，在管中加入 40μL 二甲基亚砜（DMSO），上下吹打使其充分混匀，盖好旋紧，等候下步使用。

2. 链霉亲和素（SA）冻干粉溶解

从-20℃冰箱中取出链霉亲和素（SA），5000g 离心 1 分钟，随后加入 75μL PBS，上下吹打使其充分混匀，SA 终浓度为 2mg/mL。

3. SuperEV 0.5 外泌体纯化柱室温平衡

从冰箱中取出 SuperEV 0.5 外泌体纯化柱，垂直固定，若无合适的垂直固定装置，可从我公司购买配套的固定组件（货号：HCS1012），室温放置至少 30 分钟，使柱子充分平衡至室温。

注意：

- 柱子平衡至室温前，不要打开顶盖和底盖。
- 柱子第一次使用，上筛板与填料表面可能存在间隙，这是储存过程中填料沉降造成的，不影响分离性能，实验前将筛板向下垂直推到填料表面即可。

二、外泌体偶联 biotin

取 600μL 外泌体至 2mL 离心管中，加入 2.4μL 反应增强液，吹打混匀，再加入 6μL biotin linker，吹打混匀，置于旋转混匀仪或震荡混匀器上，室温震荡孵育 1.5 小时，即得到 exo-biotin 反应物。

组分	加入体积 (μL)	过程
外泌体	600	室温孵育 1.5 小时
反应增强液	2.4	
biotin linker	6.0	

三、exo-biotin 的纯化

1. 柱平衡（可在外泌体偶联 biotin linker 时完成）

1) 将收集管（烧杯或普通离心管）放置在 SuperEV 0.5 外泌体纯化柱下方，打开顶盖，

用移液器吸弃上方的保存液；

- 2) 取下底盖，分次共加入 20mL PBS 冲洗柱子；
- 3) 冲洗过程始终保持顶部筛板湿润，避免柱体变干。冲洗完成后，盖上底盖，加入少量 PBS 等待后续操作。

2. **exo-biotin** 过柱纯化（去除游离的 **biotin linker** 分子）

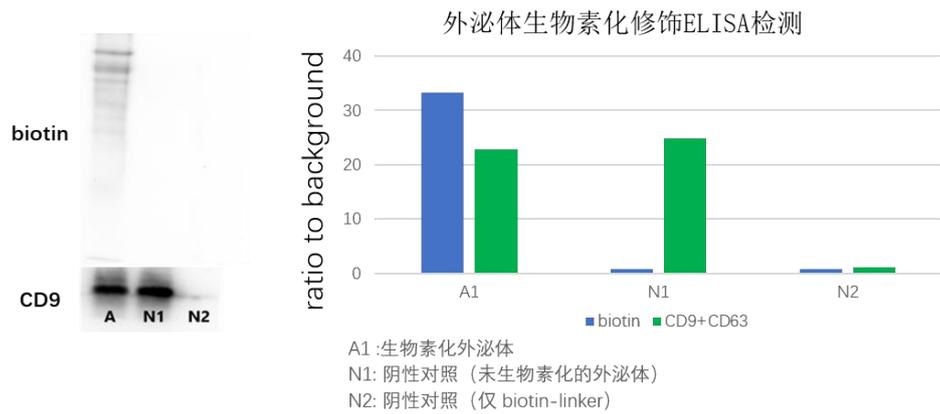
- 1) 吸弃 SuperEV 0.5 纯化柱筛板上方的 PBS，取下柱子底盖，下方放置 5mL 离心管；
- 2) 将 **exo-biotin** 反应物混匀，瞬时离心，使液体全部集中在管底；
- 3) 在筛板上方加入全部的 **exo-biotin** 反应物（约 600 μ L），待样品全部进入筛板、出口无液体流出时，加入 2.9mL PBS。当液体全部流出后，收集完毕。该馏分大约 3.5mL，不含外泌体，可直接丢弃。
- 4) 继续加入 1.2mL PBS 进行洗脱，用 2mL 离心管收集馏分。待出口无液体流出时，该馏分收集完毕。**exo-biotin** 集中在该馏分。
- 5) 收集完毕后，柱子可直接丢弃。
- 6) 本试剂盒操作过程不是无菌操作，在进行下游细胞实验或体内实验前，必须将生物素修饰的外泌体进行 0.22 μ m 滤膜过滤，以保证无菌。

实验数据分析

1. ELISA 和 Western Blot 证实外泌体表面成功标记生物素

按本试剂盒操作方法，将生物素修饰在尿外泌体表面（A），阴性对照 N1 为尿外泌体，不偶联 **biotin linker** 直接纯化，阴性对照 N2 为相应浓度的 **biotin linker**，直接过柱纯化。

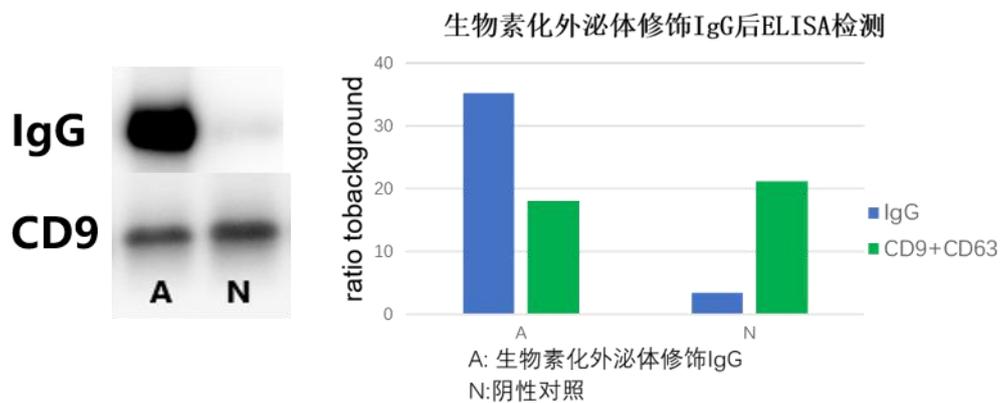
Western Blot 和 ELISA（双抗体夹心法，CD9+CD63 捕获外泌体后再检测 **biotin** 或 CD9+63）检测结果证实本试剂盒可成功将生物素修饰在外泌体表面。



2. 生物素化外泌体实现蛋白表面修饰实例

按本试剂盒操作方法，对尿外泌体进行生物素化修饰及纯化，取 600 μ L，加入链霉亲和素 (SA)，使其终浓度为 0.25 μ M，37 $^{\circ}$ C 反应 20 分钟后，再加入 0.5mg/ml 带有生物素标记的 IgG 抗体 150 μ L，37 $^{\circ}$ C 反应 20 分钟，最后通过 SuperEV 0.5 外泌体纯化柱纯化，得到的纯化的 IgG 修饰外泌体为 A。阴性对照 (N) 的外泌体只是不修饰生物素，其余操作与 A 一致。

Western Blot 和 ELISA (双抗体夹心法，CD9+CD63 捕获外泌体后再检测 IgG 或 CD9+63) 证实本试剂盒可成功将 IgG 蛋白修饰在外泌体表面。



相关产品信息

相关产品	目录号
外泌体浓缩试剂盒（细胞培养上清或尿液）	EXOCon10-10/ EXOCon40-10
外泌体纯化试剂盒(SuperEV 柱+浓缩柱)	EXOSECon0.5-5/ EXOSECon1.0-3/ EXOSECon3.0-2
外泌体表面修饰试剂盒（SA-Biotin）	ExoSMSA05-1/ ExoSMSA10-1
蛋白质生物素标记和纯化试剂盒	Probio10-1/ Probio20-1
外泌体表面修饰试剂盒（靶向蛋白）	ExoSMpro05-1/ ExoSMpro10-1/
DiO-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (green)	EXOPDiO10-1/ EXOPDiO20-1
DiI-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (red)	EXOPDiI10-1/ EXOPDiI20-1
DiR-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (red)	EXOPDiR10-1/ EXOPDiR20-1
PKH67-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (green)	EXOPPKH67-10/ EXOPPKH67-20

技术支持

关于查看详细产品信息和下载相关资料请登陆：<http://www.rengenbio.com>

同时可通过电话或 Email 接触技术支持。

公司：**辽宁润基生物科技有限公司**

地址：辽宁省沈阳市经济技术开发区十三号路 77 号联东 U 谷 20 号楼

邮编：110027

电话：024-31086590

传真：024-31086589

邮箱：公司信息 info@rengenbio.com

技术支持 support@rengenbio.com

产品订购 order@rengenbio.com



微信公众号



外泌体研究交流群