

产品使用说明书

---

**SuperEV™ 超纯尺寸排阻色谱柱**

**SuperEV™ Ultrapure Columns**

**Cat.# EXOSEC0.5-5**

---

辽宁润基生物科技有限公司

Liaoning Rengen Biosciences Co.,Ltd

Version 1.0

15/8/2019

## 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 .....	4
实验数据分析 .....	7
相关产品信息 .....	9
简略操作方法.....	10
技术支持 .....	12

## 保存与应用

### 【保存条件】

常温或 4℃ 运输，收到试剂盒后直立放置，置于 2-8℃ 保存，有效期 12 个月。**请勿冷冻！**

### 【应用范围】

本产品只用于科学研究，不能用于临床诊断。

1. 本产品是基于尺寸排阻色谱原理，根据被分离组分的分子大小实现胞外囊泡（EVs）的分离和纯化。
2. 适合大部分生物样品（血清、血浆、尿液等）和细胞培养上清中分离和纯化 EVs。
3. 分离的 EVs 可用于鉴定（NTA，TEM，FACS 和 Western Blot），蛋白质谱分析，RNA 提取和测试，高通量测序，体外标记和修饰及细胞实验等。

## 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 (Extracellular Vesicles, EVs)。外泌体普遍存在于多种体液中，其内容物丰富，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，主要参与免疫抗原呈递，神经递质传递，脂类代谢及细胞信号转导等过程，并与多种疾病的发生、发展、治疗及预后密切相关。

尺寸排阻色谱法 (Size Exclusion Chromatography, SEC) 被认为是从不同样本中分离和纯化细胞外囊泡 (EVs) 的最佳方法之一，因为它能够快速而有效地将 EVs 从复杂样本中分离出来，并能保持 EVs 的原始形状和生物学功能。我们开发了用于分离 EVs 的不同类型的 SEC 柱：**SuperEV0.5**，**SuperEV1.0** 和 **SuperEV3.0**，适合不同样本和体积的 EVs 分离。此外，我们还提供 SEC 柱和浓缩柱的不同组合，既可以从更大体积的细胞培养上清或尿液中分离 EVs，同时又可以 将 SEC 柱分离的 EVs 进一步浓缩和纯化，提供完整的纯净 EV 的解决方法，适合于 EVs 的工业化制备。

### 【主要特性】

SuperEV 0.5 超纯色谱柱	上样体积	最多 0.75mL，最佳 0.5mL*
	柱床体积	10mL
	馏分体积	0.5mL
	空隙体积	3.5mL
	冲洗体积	15mL
	EVs 收集体积	1.5mL
	操作温度	18-28℃
	缓冲液	PBS
	稳定工作的 pH 范围	3-13
	有效期	12 个月

\* 建议样品上样量为 **0.5mL**，以获得高纯度和高回收率的 EVs，上样量最高可达 **0.75mL**，但后面馏分的 EV 纯度略有下降，具体参考“实验数据分析”中样品上样体积研究。

## 【主要特点】

- 耗时短，分离时间约 **15** 分钟。
- 操作简便，无需特殊设备。
- 重复性好，可重复使用 **5** 次。
- 操作温和，最大程度保持胞外囊泡（EVs）完整形态结构和生物学功能；
- 回收率高，大于 **78%**。
- 纯度高，总蛋白去除约 **99.9%**，脂颗粒去除约 **90%**。
- 操作过程仅加入 PBS 缓冲液，对下游实验无干扰。

## 试剂盒组成和说明

组分名称	数量	保存温度
SuperEV 0.5 超纯色谱柱	5 支/盒	2-8℃

### 需自备试剂

1. PBS 缓冲液，经 0.22μm 滤膜过滤
2. 纯水，经 0.22μm 滤膜过滤
3. 20%乙醇水溶液
4. 超滤管（截留分子量为 100KD）
5. 收集管（烧杯，普通离心管）

## 操作方法

### 1. 柱平衡

从冰箱中取出 SuperEV 0.5 超纯柱，垂直固定，如果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，使柱子温度充分平衡到室温（18-28℃），温度过高过低，柱体可能会引入气泡，影响分离效果。使用的 PBS 缓冲液，同样平衡至室温。

#### 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。
- 尽量用当天新配的 PBS，经 0.22μm 膜过滤，避免引入微生物和颗粒物，以免堵塞筛板。

将收集管（烧杯或普通离心管）放置在柱子下方，先打开顶盖，用移液器吸弃上方的保存液，加入约 5mL 超纯水（经 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤），取下底盖冲洗柱子，待液体全部进入筛板，出口无液体流出，继续加入 15mL PBS 冲洗。整个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. 样品处理

### 样品上样量

样品类型	上样量
血清或血浆	最大 0.75mL，最佳 0.5mL
浓缩的细胞培养上清或尿液	

### 样品处理

样品类型	操作步骤
血清、血浆	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 5,000<math>\times</math>g 离心 20 分钟，取上清</li> <li>● 0.45<math>\mu</math>m 滤膜过滤</li> </ul>
细胞培养上清	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 3,000<math>\times</math>g 离心 20 分钟，取上清</li> <li>● 可选择截留分子量为 100KD 超滤管浓缩 20 倍，浓缩液蛋白浓度不得高于 <b>100ug/uL</b></li> <li>● 或采用我公司“<b>细胞培养上清外泌体浓缩试剂盒(EXOCCon40-10)</b>”浓缩 20 倍，最高可浓缩 50 倍</li> </ul>
尿液	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 3,000<math>\times</math>g 离心 20 分钟，取上清</li> <li>● 可选择截留分子量为 100KD 超滤管浓缩 20 倍，浓缩液蛋白浓度不得高于 100ug/uL</li> <li>● 或采用我公司“<b>尿液外泌体浓缩试剂盒(EXOUCon40-10)</b>”浓缩 20 倍，最高可浓缩 50 倍</li> </ul>

## 3. 样品上样和 EVs 收集

用移液器吸弃筛板上方的 PBS，取下柱子底盖，在筛板上方加入不超过 0.75mL（最适 0.5mL）的样品，柱子下方放置 5mL 离心管进行第 1 馏分的收集。待样品全部进入筛板后，再加入一定量的 PBS（PBS 量=3.5mL-样品上样量）。待液体全部进入筛板下方，出口无液体流出，收集完毕。收集的第 1 馏分为空隙体积，大约 3.5mL，该馏分不含 EVs。

**注意：**

- 加入样品后，必须等所有样品进入筛板后，才能继续加入 PBS，避免样品被稀释。
- 加入 PBS 的量为 3.5mL-样品上样体积，如上样量为 0.5mL 时，加入 PBS 3mL，上样量为 0.75mL 时，加入 PBS 2.75mL。

继续加入 PBS 进行洗脱，用 1.5mL 离心管收集馏分。每次加入 0.5mL PBS，待洗脱液全部进入筛板后，出口无液体流出时，该馏分收集完毕。再加入下一个 0.5mL PBS 进行收集。每个馏分收集体积为 0.5mL。EVs 主要集中在馏分 2, 3, 4，总体积约为 1.5mL。

**注意：**

- 整个洗脱过程始终保持顶部筛板湿润，避免柱体变干。
- 不同类型样品可能会有不同的洗脱谱和纯度，建议初次使用时，对收集的馏分做 EVs 和蛋白浓度测定。

#### 4. 柱体冲洗

含 EVs 的馏分收集完毕后，用不少于 15mL PBS 对柱体进行冲洗，冲洗后的柱子可直接用于下一个样品处理，或加入保存液，2-8℃ 储存。

**保存液：**20%乙醇或 0.05% (W/V) 叠氮钠水溶液。

**注意：**当分离的 EVs 馏分用于 RT-PCR 或高通量测序时，为避免交叉污染，建议一根柱子只用一次或仅重复用于同一样品。

#### 5. 清洗和再生

变性蛋白或脂蛋白在柱子冲洗过程中可能无法完全被洗脱，积累过多会对分离的纯度产生影响，可按以下方法进行再生：10 mL 0.5M NaOH 清洗，然后用 PBS 冲洗柱子，直至流出液 pH 为中性，一般需 20-30mL PBS 缓冲液。

**注意：**当柱子颜色有变化或流速明显下降时，建议进行清洗和再生。

#### 6. EVs 馏分浓缩（富集）

收集到的 EVs 馏分可做 EVs 浓度和蛋白浓度直接测定，根据实验需要决定是否浓缩或富集。若需要浓缩或富集，建议采用截留分子量为 100KD 超滤管，2,000×g 离心浓缩，如 Millipore Amicon Ultra-15ml (MWCO 100kD) 或 Sartorius Vivaspin 2/15 ml (MWCO 100kD)，也可从我公司直接购买配套的 15mL 超滤管（货号：**HCF10050**）或“细胞培养上清外泌体浓缩试剂盒”进行浓缩。

## 实验数据分析

### 1. 血清过 SuperEV0.5 柱洗脱峰及样品上样体积的研究

将 0.5mL 处理的血清加入 SuperEV 0.5 柱，收集馏分 1 (3.5mL) 和另外 13 个馏分 (0.5mL/馏分)。采用 CD63×CD9 双抗夹心 ELISA 法测定 EVs 浓度，BCA 法测定蛋白浓度。从图 1 看出，EVs 主要集中在馏分 2, 3 和 4；从馏分 6 开始，蛋白逐渐被洗脱出，馏分 12 左右达到顶峰。

当上样体积增加时，外泌体洗脱会有拖尾现象，各馏分的蛋白浓度有所增加，EVs 馏分纯度略有下降。因此考虑 EVs 的纯度和回收率，最大上样体积为 **0.75mL**，最佳的上样体积为 **0.5mL**，这样不仅回收率高，纯度也最高。

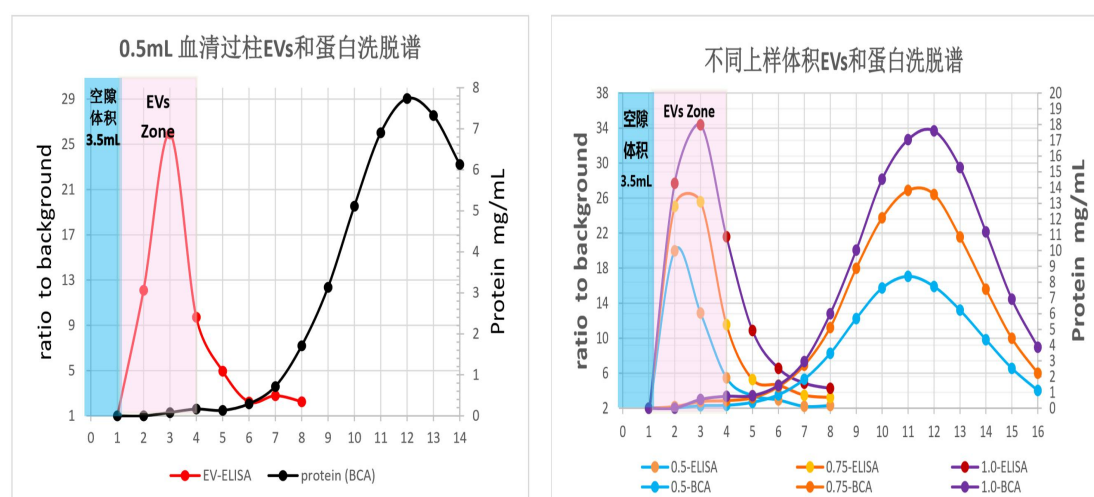
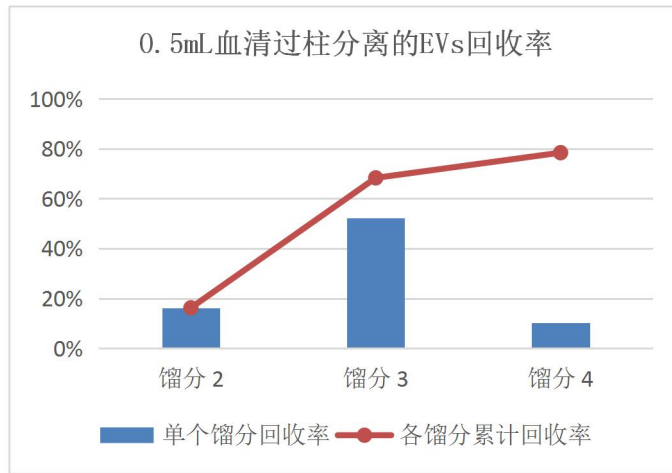


图 1 (a) 0.5mL 血清过 SuperEV 0.5 柱的 EVs 和蛋白洗脱谱；图 1 (b) 不同体积血清上样 (0.5mL, 0.75mL, 1.0mL) 过 SuperEV 0.5 柱时 EVs 和蛋白洗脱谱。

### 2. 回收率和稀释度

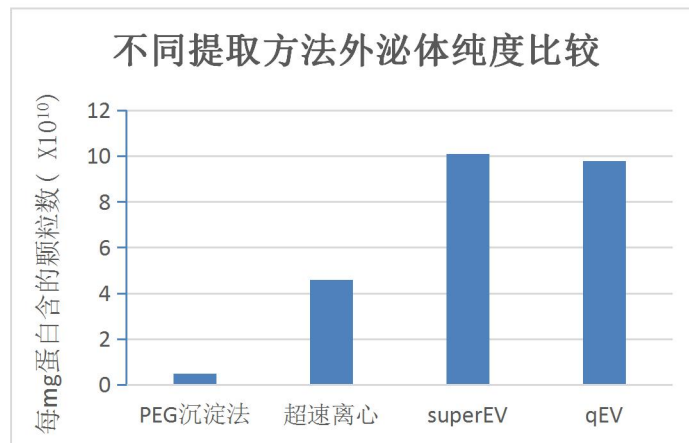
使用已知浓度的外泌体冻干粉作为标准品，按不同比例进行稀释并制作 ELISA 标准曲线。同时检测馏分 2-4 和对应的血清样品。根据标准曲线计算馏分 2-4 和血清的 EVs 浓度。

收集馏分 2 和 3，稀释度为 2，回收率为 **68.3%**；收集馏分 2-4，回收率为 **78.4%**，稀释度为 3。收集的馏分数目越多，回收率越高，稀释度越大，EVs 纯度也会相应降低。



### 3. 纯度分析

以每 mg 蛋白质对应的颗粒浓度 (particles/mg) 评估各提取方法分离的 EVs 纯度，superEV0.5 柱分离的 EVs 纯度明显高于沉淀法和超速离心法。

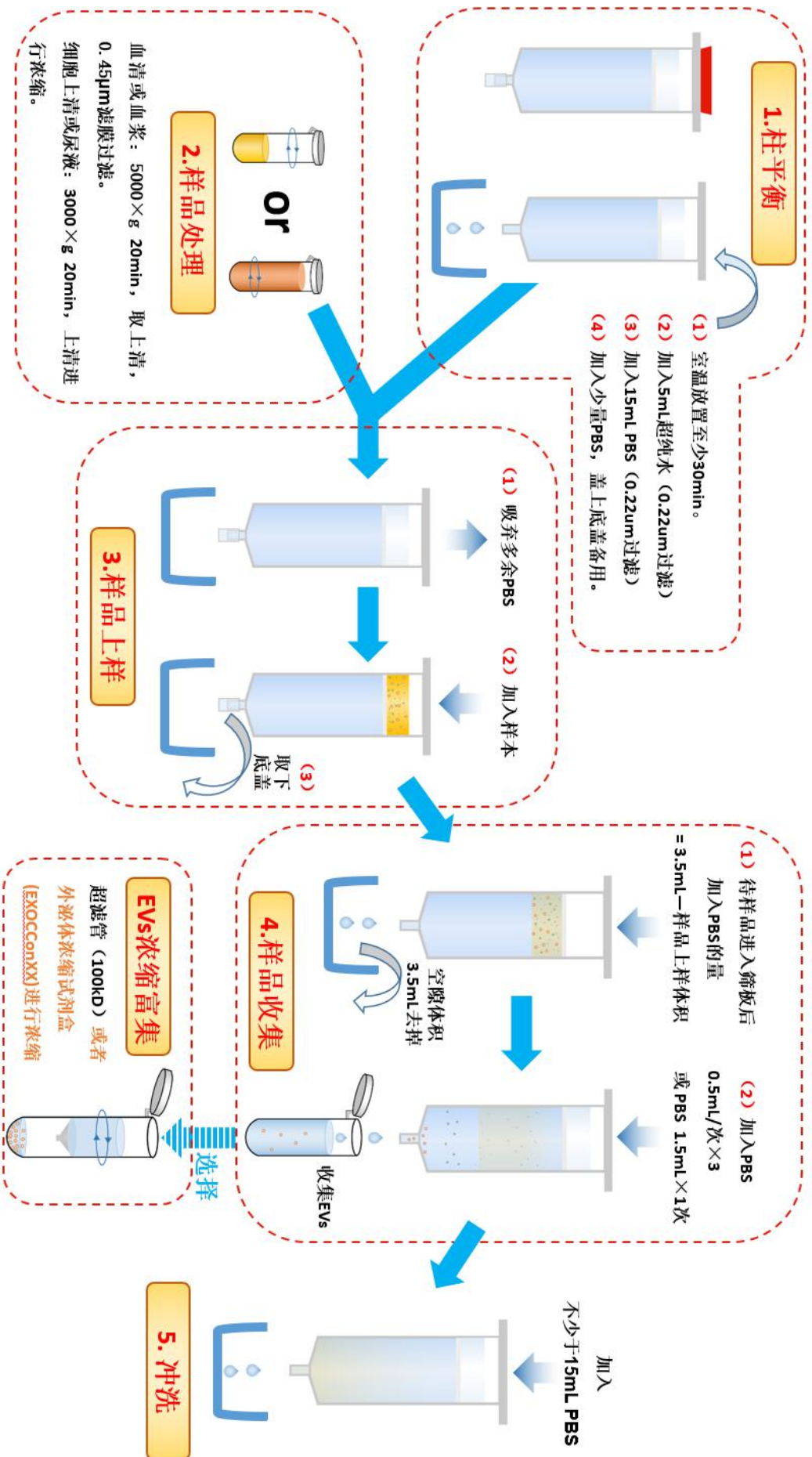




## 相关产品信息

相关产品	目录号
外泌体提取试剂盒(血清/血浆)	EXORG50A-1/ EXORG30A-1
外泌体浓缩试剂盒 (细胞培养上清/尿液)	EXOCCon10-10/ EXOUCon10-10
外泌体 DNA 分离试剂盒	EXODNA50C-1/ EXODNA30C-1
外泌体 RNA 分离试剂盒	EXORNA50C-1/ EXORNA30C-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
外泌体 Markers 检测试剂盒 (Western Blot)	EXOWBxx-5
外泌体捕获和定量试剂盒 (ELISA)	RGEXOx96-1
外泌体捕获和分离试剂盒 (磁珠抗体捕获)	EXOMCUxx-10/ EXOMSPxx-10/
外泌体纯化色谱柱	EXOSEC1.0-3/ EXOSEC3.0-2
外泌体纯化试剂盒(血清或血浆)	EXOSECSP0.5/ EXOSECSP1.0 / EXOSECSP3.0
外泌体纯化试剂盒(细胞培养上清)	EXOSECC0.5/ EXOSECC1.0/ EXOSECC3.0
外泌体纯化试剂盒(尿液)	EXOSECU0.5 / EXOSECU1.0 / EXOSECU3.0

# 简略操作方法





## 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](mailto:info@rengenbio.com)

技术支持 [support@rengenbio.com](mailto:support@rengenbio.com)

产品订购 [order@rengenbio.com](mailto:order@rengenbio.com)



微信公众号



外泌体研究交流群