



产品使用说明书

外泌体表面修饰试剂盒 (SA-Biotin)

Exsomes Decorating Kit (SA-Biotin)

Cat.# **ExoSMSA05-1**
 ExoSMSA10-1

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	7
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。

本产品适用于生物素化的蛋白、多肽、小分子和核酸进行外泌体表面修饰。

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。

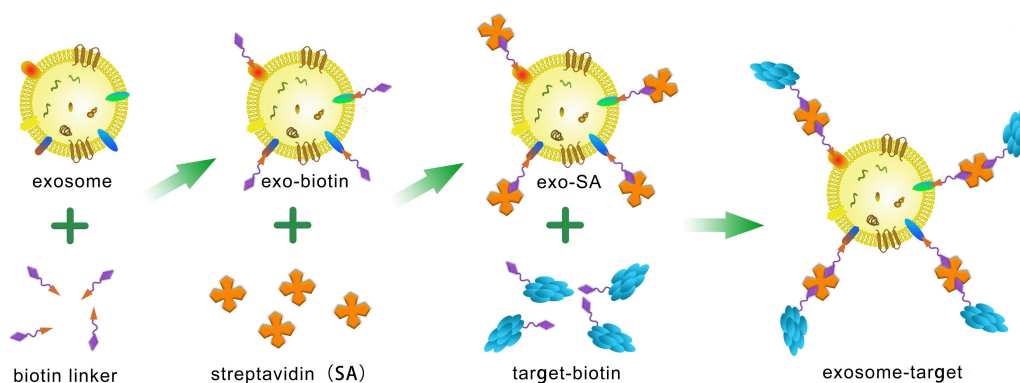
作为天然的胞间信息载体,外泌体免疫原性低,生物相容性高,在人体血液中比较稳定。能够利用增强渗透滞留效应(Enhanced Permeation and Retention effect, EPR),有选择性的渗透和滞留在肿瘤或炎症组织部位,可穿透血脑屏障等。不仅可以通过其内源内容物直接对受体细胞进行治疗,也可以作为药物载体,递送化学药物、蛋白质、多肽及基因药物,在医疗领域具有巨大的应用潜力。

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。

本试剂盒首先通过化学连接的方法,将生物素偶联在外泌体表面,通过 SEC 分子排阻柱去除游离的生物素,得到大量纯净的生物素化外泌体。生物素化的外泌体先通过与链霉亲和素结合(含有 4 个生物素结合位点),然后再与带有生物素标记的蛋白、多肽、小分子和核酸进行连接,最后实现蛋白、多肽、小分子、核酸在外泌体表面的修饰(靶向)。

本试剂盒反应条件温和,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,为外泌体表面修饰提供了一个高效、通用的修饰平台。



试剂盒组成和说明

组分名称	Cat.# ExoSMSA05-1	Cat.# ExoSMSA10-1	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	50μL×1 支	100μL×1 支	2-8°C
链霉亲和素 (SA)	150μg×1 支	300μg×1 支	-20°C避光、干燥
SuperEV 0.5 外泌体纯化柱 (货号: EXOSEC0.5-5)	5 支	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. 二甲基亚砜 (DMSO)
2. PBS 缓冲液 (pH 7.2-7.6)
3. 0.22um 滤膜
4. 收集管 (烧杯, 2mL 和 mL 离心管)
5. 旋转混匀仪或震荡混匀仪
6. 恒温培养箱 (37°C)

【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. 为达到较好的修饰效果，生物素化的蛋白、多肽、小分子、核酸浓度不低于 4μmol/L。
7. 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。

8. 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 6.0μL 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 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，可用于下步操作。
- 5) 收集完毕后，用 20mL PBS 对柱体进行冲洗，冲洗后的柱子加入少量 PBS，盖上底盖，等待后续操作。

四、exo-biotin 通过 SA 与 biotin-目标物质偶联和纯化

1. exo-biotin 与链霉亲和素（SA）连接

在装有 exo-biotin 纯化物的离心管中，加入 9.9 μ L 链霉亲和素（SA），吹打混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 20min，即可得到偶联 SA 的外泌体，即 exo-SA。

2. exo-SA 与 biotin-目标物质连接

选择想要连接的生物素化的蛋白、多肽、小分子或核酸，取部分样品，将浓度稀释为 4 μ mol/L，取 300 μ L 直接加入到上一步的 exo-SA 反应液中，上下颠倒混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 20min。随后对反应物作进一步纯化，步骤如下：

步骤	组分	加入体积 (μL)	过程
1	exo-biotin	1200	37°C 孵育 20 分钟
	链霉亲和素 SA (2mg/mL)	9.9	
2	Biotin-目标物质 (4μmol/L)	300	37°C 孵育 20 分钟
3	SuperEV 0.5 纯化柱纯化×2 次, 每次上样 750μL		

3. exo-SA 与 biotin-目标物质连接反应混合物纯化

- 1) 使用冲洗后的 SuperEV 0.5 外泌体纯化柱进行纯化, 步骤同前。
- 2) 吸弃纯化柱筛板上方的 PBS, 取下柱子底盖, 下方放置 5mL 离心管。
- 3) 将反应混合物混匀, 瞬时离心, 使液体全部集中在管底。
- 4) 在筛板上方加入 750μL 反应混合物, 待样品全部进入筛板, 出口无液体流出时, 加入 2.75mL PBS。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。
- 5) 继续加入 1.5mL PBS 进行洗脱, 用 5mL 离心管收集馏分, 待出口无液体流出时, 该馏分收集完毕, 修饰了目标物质的外泌体收集在该馏分。
- 6) 收集完毕后, 用 20mL PBS 对柱体进行冲洗。
- 7) 冲洗完毕后, 继续将剩余的 750μL 的反应混合物加入纯化柱中, 进行纯化, 步骤同 4) 和 5)。
- 8) 收集完毕, 柱子可直接丢弃。
- 9) 本试剂盒操作过程不是无菌操作, 在做下游细胞实验或体内实验前, 必须将修饰的外泌体进行 0.22um 滤膜过滤, 以保证无菌。

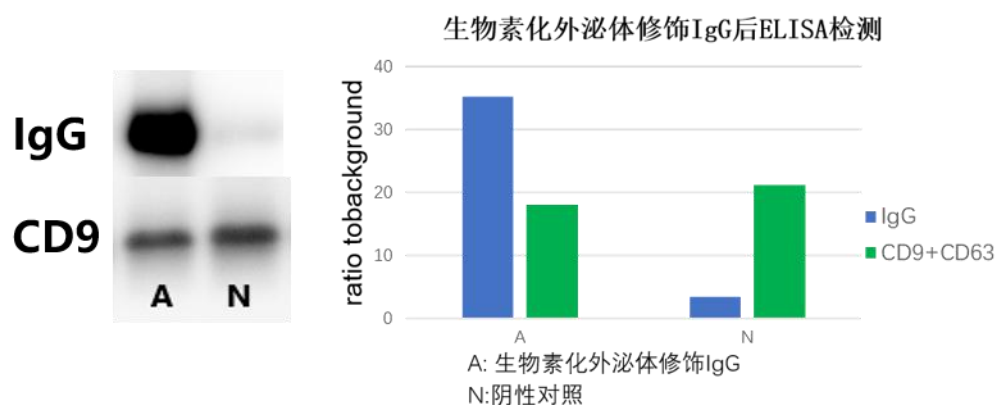
实验数据分析

1. 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并纯化后, 取 1.2mL, 加入链霉亲和素, 使其终浓度为 0.2uM, 37°C 反应 20 分钟, 再加入 0.5mg/mL 带有生物素标记的 IgG 抗体 300μL, 37°C 反应 20 分钟, 最后通过 SuperEV 0.5 外泌体纯化柱纯化, 得到纯化的 IgG 修饰的外泌体为 A。阴性对照 (N) 体系中只是不加入链霉亲和素 (SA), 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) 从下图中可说明, 本试剂盒可成功将生物素化的 IgG 蛋白修饰在外泌体表面。



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

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