

EVMag™ Isolation & Label Kit PS (from cell culture medium and serum)

Catalog Number: EM23011

Store at 2°C to 8°C

Product Description:

EVMag Isolation & Label Kit PS 利用细胞外囊泡 (Extracellular Vesicles, EVs) 膜表面磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 与受体蛋白 Annexin V 的高度选择性和亲和性, 可轻松实现细胞培养上清液中 EVs 的分离纯化以及高效标记。

磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 可自发的跨细胞膜移位, 在正常健康细胞中, 细胞通常是通过 ATP 依赖的氨基磷脂翻转酶将 PS 固定在细胞膜的内侧。当细胞发生凋亡时, 这些翻转酶被 Caspases 裂解, 从而破坏了这种不对称分布, 导致 PS 暴露在细胞膜表面, 从而引发巨噬细胞的吞噬作用。

EVs 在其分泌过程中, 大量消耗 ATP, 导致细胞质来源的 ATP 被耗尽, 使得 PS 自发跨膜暴露在 EVs 的膜表面。

本方法首先利用生物素化 Annexin V 蛋白将细胞培养上清中的 EVs 高效率吸附于链霉亲和素修饰的磁珠表面。由于 Annexin V 蛋白与 PS 的结合高度依赖钙离子, 随后经过含有 EDTA 螯合剂的洗脱缓冲液轻松实现的 EVs 的无损洗脱, 短时间内实现高纯度结构完整的 EVs 的获取以及标记。整个过程基于磁分离进行, 使得 EVs 的捕获及标记洗涤简单易行, 结合 Flow NanoAnalyzer 就可进行外泌体的理化性质综合表征, 有效提高标记效率、降低标记背景的同时大大节约了操作时间。富集得到的外泌体还可以应用于各种下游应用, 如电子显微镜分析、纳米颗粒跟踪分析和各种成分 (包括蛋白质、核酸和脂质等) 的生化分析。

Feature:

- 采用 PS 亲合法分离纯化外泌体, 特异性好。
- 纯化效率高, 可轻松获得高产率的外泌体。

- 可获得更高纯度的外泌体, 纯度可达到 90% 以上。
- 无损洗脱获得完整的外泌体, 支持下游的各种应用。
- 标记后洗脱, 一步实现外泌体的理化性质综合分析。
- 操作简便、耗时短。
- 无需超离。

Product Contents:

组份	规格 (20 tests)
Magnetic Beads	1.0 mL × 1 tube
Capturer	0.2 mL × 1 tube
10× Washing Buffer	20 mL × 1 tube
500× Binding Enhancer	1.5 mL × 1 tube
10× Elution Buffer	1.5 mL × 1 tube
Labeling marker	可定制

General Guidelines:

为了确保分离的外泌体来源于你感兴趣的细胞, 请用 EV-depleted FBS 培养细胞, 因为正常的胎牛血清中含有极高水平的外泌体, 会污染细胞来源的外泌体。如果不能获得 EV-depleted FBS, 某些细胞系可以在不含 FBS 的培养基中培养 12 小时。

Procedure:

1. 样品制备

【细胞上清制备（建议）】

- 1) 在适当的条件下培养细胞；
- 2) 收集细胞培养基；
- 3) 4 °C，2,000 g 离心 10 分钟，去除细胞碎片；
- 4) 将步骤 3) 所获得的上清液转移到一个新的管中（可作为 2,000 g 离心上清样品）；
- 5) 4°C，10,000 g 离心 30 分钟，去除 Large EVs 以及凋亡小体；
- 6) 将步骤 5) 所获得的上清液转移到一个新的管中（可作为 10,000 g 离心上清样品）。

注：提取 Exosomes + Mircovesicles 时，可使用 2,000 g 上清作为提取样品；回收 Exosomes 时，可使用 10,000 g 上清作为提取样品。

2. Buffer 制备

Buffer	实际使用量	建议配置量
1× Washing Buffer	8.5 mL	10.00 mL
1× Elution Buffer	100 μL	200 μL

- 1) 1× Washing Buffer: 分别向离心管中加入 1 mL 10× Washing Buffer、9 mL 蒸馏水和 20 μL 的 500× Binding Enhancer，混匀即可，现用现配，常温保存。
- 2) 1× Elution Buffer: 分别向离心管中加入 20 μL 10× Elution Buffer 和 180 μL 蒸馏水，充分混匀，现用现配，常温保存。

注：确保 1× Washing Buffer 中有添加 1/500 V 的 Binding Enhancer，未添加或者加入量过多时，外泌体的回收效率都会显著降低。

3. Annexin V 磁珠固定化

- 1) 将 Magnetic Beads 经涡旋混合器充分混匀后，确保管底部磁珠被充分悬浮，取 50 μL 转移到新的 1.5 mL Ep 管中；
- 2) 向 1.5 mL Ep 管中然后加入 500 μL 1× Washing Buffer 对磁珠进行清洗；
- 3) 简单离心后，将 Ep 管放置于磁力架上静置 1~2 min，使磁珠与溶液彻底分离，取出上清液；
- 4) 步骤 2) -3) 重复 3 次；
- 5) 加入 500 μL 1× Washing Buffer 和 10 μL Capturer，涡旋混匀，至于 3D 混匀仪中，4 °C 混合反应 10 min；
- 6) 简单离心后，将 Ep 管放置于磁力架上静置 1~2min，使磁珠与溶液彻底分离，取出上清液；
- 7) 步骤 2) -3) 重复 3 次。

4. 亲和反应

- 1) 取 1 mL 离心后细胞上清样品加入到一个新的 1.5 mL Ep 管中，并添加 1/500 V 的 500× Binding Enhancer，涡旋混匀；
- 2) 或取 50 μL 血清样品加入到一个新的 1.5 mL Ep 管中，PBS 补齐至 1 mL，并添加 1/500 V 的 500× Binding Enhancer，涡旋混匀；
- 3) 将混合后的样品全部转移至含有 Capturer 固定化磁珠的 1.5 mL Ep 管中，涡旋混匀，至于 3D 混匀仪中，4 °C 混合反应 1 h（该反应时间可适当延长）；
- 4) 简单离心后，将 Ep 管放置于磁力架上静置 1~2 min，使磁珠与溶液彻底分离，取出上清液；
- 5) 然后向 1.5 mL Ep 管中加入 1 mL 1× Washing Buffer（确保含有 1/500 V 的 500× Binding Enhancer）对磁珠进行清洗。
- 6) 步骤 4) -5) 重复 3 次。

注：若样本量超过 1 mL，建议使用超滤装置将样品浓缩至 1 mL 或更少。虽然可以通过浓缩样品有效地获得大量的 EVs，但它可能会造成物理损伤或生物活性失活，请根据使用目的考虑适当的处理方法。

5. 抗体标记（可选步骤）

- 1) 将步骤 4 获得的磁珠-外泌体用 48 μ L 1 \times Washing Buffer（确保含有 1/500 V 的 500 \times Binding Enhancer）重悬；
- 2) 向用 Washing Buffer 重悬后磁珠-外泌体中加入 2 μ L 抗体，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h；
- 3) 简单离心后，磁力架静置 1~2 min，彻底分离磁珠与溶液，然后加入 500 μ L 1 \times Washing Buffer 对磁珠进行清洗；
- 4) 重复步骤 3）3 次。

6. 外泌体洗脱

- 1) 向亲和反应后的 1.5 mL Ep 管中加入 100 μ L 1 \times Elution Buffer，洗脱完全后进行简单离心，然后将 Ep 管放置于磁力架上静置 1~2 min，使磁珠与溶液彻底分离，取出上清液转移至新的 Ep 管中。
- 2) 若洗脱所得外泌体浓度过高，可再向 1.5 mL Ep 管中加入 100 μ L 1 \times Elution Buffer，重复步骤 1)，上清液转移至同一 Ep 管。

注：使用过的外泌体捕获固定化磁珠可回收用于重复提取同一样品中剩余的 EVs 或者从同一批培养上清样品和体液样品中纯化 EVs。

固定化磁珠存储条件：可选择含有 0.05 w/v% 叠氮化钠的 TBS，4 $^{\circ}$ C。回收磁珠建议尽快使用，储存时间不要过长，会降低磁珠使用寿命。

Related Products:

Code No.	Description	Size
NHA009-A488-50T	Alexa Flour 488 Mouse Anti-Human CD9	20 Tests
NHA009-A647-50T	Alexa Flour 647 Mouse Anti-Human CD9	20 Tests
NHA063-A488-50T	Alexa Flour 488 Mouse Anti-Human CD63	20 Tests
NHA063-A647-50T	Alexa Flour 647 Mouse Anti-Human CD63	20 Tests
NHA081-FITC-50T	FITC Mouse Anti-Human CD81	20 Tests
NEPU-638-50T	EVs Membrane Red	20 Tests
NEPU-528-50T	EVs Membrane Green	20 Tests