

【Merck & Millipore】Amicon® Ultra 超滤管

——超滤法制备外泌体

截留精准 高回收率

让样本制备如此简单

用膜进行样品处理的好处很多，如操作简便，效果稳定可靠，成本效益高等。超滤的性能依赖于对膜孔径规格的严格工艺控制。超滤膜可截留 1-1000kDa 的分子，盐和水等小分子会透过，因此在大分子样品处理中得到了广泛应用，包括截留样品的纯化、浓缩，及流穿样本的处理等。



默克 Amicon® Ultra 超滤管采用低蛋白吸附的 Ultracel® 再生纤维素超滤膜，确保更精准的截留分子量和更高的蛋白回收率。因其优异的性能，Amicon® Ultra 超滤管已被广泛应用于多种样品制备的场景，包括蛋白 / 抗体 / 酶 / 核酸等生物样本的浓缩、脱盐和缓冲液置换、病毒 / 噬菌体 / 外泌体 / 囊泡 / 微粒等样本的纯化、药物筛选、药物结合实验、蛋白富集、小分子物质去除、分析样品前处理等，为科学研究提供高效的创新方案。

Amicon® Ultra 超滤管的独特优势：

- **高回收率：**超滤膜的截留精准，非特异吸附低，>90%回收率
- **不易堵塞：**双侧竖膜设计，不易堵塞，提高效率
- **避免污染：**热封技术，无粘合剂，防止溶出物污染
- **性能稳定：**一体化设计，合理死体积，数据平行性、重现性好
- **广泛兼容：**pH 3-13 适用，化学兼容性好

Tips

“就地取材”快捷制备外泌体

外泌小体 (Exosome) 是一种囊泡结构，直径通常在 30-150nm，常见于正常体液和病理样本，培养细胞也可分泌。研究人员已经在血液、唾液、尿液、母乳等中发现外泌小体，其运载的蛋白和核酸涉及其细胞间物资、信息交流，影响和调控着多方面的生理功能，包括肿瘤发生、免疫促进、凋亡调控、血管生成、炎症反应及发育和分化等。由于在体液中出现，外泌小体对于临床生物标志物检测特别有利，成为体外诊断、biomarker 研究的新热点。

近年来随着分离纯化技术的提高，关于外泌小体的研究成果颇丰；这进一步吸引了越来越多领域的课题将外泌体纳入研究对象。研究的前提是方便、高效、标准化地分离纯化外泌小体。经过近 20 年的化外泌小体。经过近 20 年的探索，已经建立了超速离心法、沉淀法、色谱法、亲和纯化法等。在大量实践中大家逐渐认识到根据下游研究对样品的要求，以及起始样品的规模、数量，可以选择不同的外泌体制备策略。因不需要特殊的设备和试剂盒，对操作人员也没有特别的经验要求，超滤法后来居上，成为实验室中制备外泌体的通用方法。

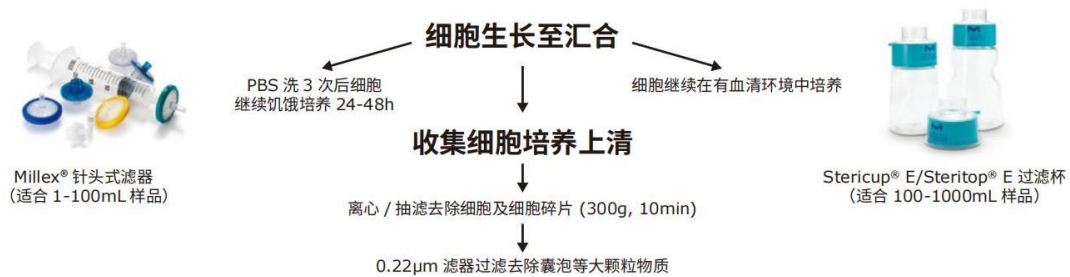
| 超速离心法 | 超滤法 | 色谱法 |
|-----------------|--------------------------|-----------|
| 经典方法(金标) | 采用常规工具, 费用低 | 分辨率好 |
| 设备昂贵, 对操作者经验要求高 | 易于根据不同样品数量、样品体积建立标准化制备方法 | 上样量小, 成本高 |

参考方案

两步法细胞上清的外泌体分离

样品收集, 微滤除细胞碎片

PS3317ENEU
Journal of Extracellular Vesicles 2015, 4: 27031 -
<http://dx.doi.org/10.3402/jev.v4.27031>



超滤制备外泌体



外泌体用于细胞学或动物实验前的无菌处理

(此步骤为选做。) 经过上述方法制备的外泌体在进行细胞或动物实验之前还需进行一步除菌过滤, 这个时候考虑到得率, 应该采用离心法处理, 以减少过滤时的外泌体样品损失。



操作步骤举例

从细胞培养上清中制备外泌体

步骤一: 样品澄清

1. 将培养基上清从培养瓶中转移到 50ml 锥形管中
2. 旋紧 Steriflip® 组件 (货号 : SCGP00525, 0.22µm, PES 膜) 至样品管顶部, 打开样品管末端
3. 倒置组件并固定在基座或架子上

4. 将调节真空源连接到 Steriflip® 装置侧面的真空端口上。打开真空使溶液通过膜进入空管。

5. 拆下 Steriflip® 装置并盖上样品。将过滤后的样品保存在 4° C 或进行囊泡富集。

本离心超滤方案基于使用 AU-15 超滤管(10 kDa MWCO, # UFC901024)处 15 mL 样品。如果要使用不同的体积或超滤管规格(AU-0.5, AU-2 或 AU-4 mL), 请参阅相应的 Amicon® Ultra 超滤管使用说明书。

步骤二：超滤管平衡

6. 向超滤管中加入 2ml PBS, 盖上盖子, 在 4,000xg 的摆桶转子中离心 10 分钟。

- 对于 AU-2 和 AU-4, 可以使用相同的离心机转速。如果要使用固定角度转子, 请查阅设备用户指南以获得适当的转速和体积限制。

- 对于 AU-0.5, 样品在可容纳 1.5 mL 管的固定转子中以 14,000xg 离心。

7. 移去超滤装置底部未过滤的 PBS, 抽取收集管里的滤液

- 对于 AU-2、AU-4 和 AU-15, 可通过移液器去除滤液。

- 对于 AU-0.5, 可 1000xg 反转离心 2 分钟去除滤液, 移除收集管中 PBS 或更换新的收集管。

步骤三：样品超滤

8. 像 AU-15 超滤管中加入 15ml 样品, 盖上盖子

9. 4,000xg 离心 30 分钟。

备注：终产品体积通常大约 500µL(30 倍浓度), 但根据样品的性质、流速和离心时间可能会有所不同。有关样品体积和终体积的估计, 请参阅对应 Amicon®Ultra 超滤管使用说明书。

10. 从离心机上取下超滤装置, 弃除收集管里的液体。

11. 往过滤装置中加入 14ml PBS, 移液器轻轻吸吐多次。4,000xg 离心 30 分钟。

12. 从过滤装置中回收浓缩样品。

- 对于 AU-2、AU-4 和 AU-15, 可用移液器吸取样品, 并多次冲洗膜侧壁(每侧 3-4 次)以确保完全回收。

- 对于 AU-0.5, 将过滤器倒扣在干净的离心管中。在 2000xg 下离心 1 分钟, 将样品转移到试管(反向旋转)。

13. 细胞外囊泡样品准备好进行分析。

注意事项及补充提示

- 无血清样品选择 3kDa 孔径是为了尽可能提高外泌体的回收率。

- 有血清样品选择 100kDa/500kDa 孔径是为了尽可能去除细胞分泌蛋白以及血清成分中小于外泌体的白蛋白造成的影响。

- 研究者可根据样品的粘稠程度, 以及需要制备的目标外泌体/囊泡/颗粒的大小分布来选择和优化超滤孔径(3kDa/10kDa/30kDa/50kDa/100kDa), 以便达到更好的得率和操作体验。

- 样品体积大于 30mL 时可以考虑用超滤杯或 Centricon plus-70 超滤管, 请注意搅拌式超滤杯在 200mL 以内时吸附损耗可能较离心式超滤管略偏高。

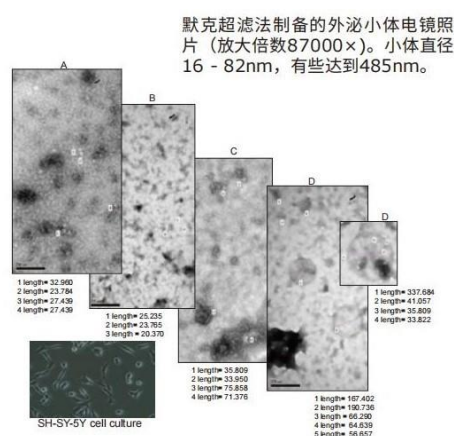
- 如需进一步提高特定外泌体的纯度, 可选用包被相应抗体的磁珠进行亲和纯化精制。

超滤法制备的外泌体参考数据

多维度分析4个SH-SY-5Y 细胞系的外泌体样品(含或不含血清)

| 样品 | 血清 | 细胞浓度 | 其实体积和终体积 | 蛋白浓度 (mg/mL) | 脂质 (相对丰度) | 外泌体浓度 (CD63 ELISA) | 外泌体浓度 (CD9 ELISA) | 外泌体直径 (nm) 平均值 |
|----|----|---------------------|--------------|--------------|-----------|--------------------|--------------------|----------------|
| A | 含 | NA | 15mL/0.5-1mL | 3.250 | 0.027 | 1.97×10^8 | NA | 33.87 (n=20) |
| B | 含 | 2.599×10^6 | 15mL/0.5-1mL | 3.238 | 0.607 | 3.9×10^8 | NA | 25.72 (n=13) |
| C | 不含 | 8.64×10^4 | 24mL/1.4mL | 0.376 | 0.002 | 1.04×10^9 | 4.72×10^8 | 38.40 (n=12) |
| D | 不含 | 2.5×10^5 | 24mL/1.4mL | 0.758 | 0.002 | 4.54×10^8 | 1.44×10^8 | 104.37 (n=18) |

不同方法制备外泌体产量比较



| 工具名称 | 处理体积 | 推荐目录号 |
|-----------------------------|--------------------|---|
| Millex® 针头式过滤器(33mm,0.22µm) | ~100mL | SLGP033RB |
| Stericup® E/Steritop® E过滤杯 | 100mL-1L | SEGPU0538,SEGPU0545,SEGPU1138,SEGPU1145,SEGPT0038,SEGPT0045 |
| Amicon® Ultra超滤管-3kDa | 0.5mL,2mL,4mL,15mL | UFC500396,UFC200324,UFC800396,UFC900396 |
| Amicon® Ultra超滤管-100kDa | 0.5mL,2mL,4mL,15mL | UFC510096,UFC210024,UFC810096,UFC910096 |
| Centricon Plus 70超滤管-3kDa | 70mL | UFC700308 |
| Centricon Plus 70超滤管-100kDa | 70mL | UFC710008 |
| Amicon® 搅拌式超滤杯(配各种孔径超滤膜片) | 50mL,200mL,400mL | UFSC05001,UFSC20001,UFSC40001 |
| Ultrafree® 微滤离心管(0.22µm) | 0.5mL,2mL | UFC30GV05 |