

MagBeads® 5微米二氧化钛磁珠（薄壳层）说明书

【产品名称】MagBeads® 5微米二氧化钛磁珠（薄壳层）

【英文名称】MagBeads® 5 μm Titanium dioxide Beads (Thin Shell Layer)

【订货信息】

货号	产品名称	规格	尺寸	溶剂	浓度
MBTi-B-5	5 微米二氧化钛磁珠（薄壳层）	5 mL	5 ± 0.2 μm	纯水	25 mg/mL
		10 mL			

【简介】

磷酸化是一种常见的可逆的翻译后修饰，在细胞信号传导等众多的生物过程中发挥调节作用，因此在肿瘤等许多疾病的研究中具有重要的意义。对磷酸化的认识有助于我们了解疾病的发生过程。磷酸蛋白和磷酸肽通常浓度极低，且电离程度差，因此很难通过质谱（MS）进行检测。因此，当前迫切需要能特异富集磷酸化肽、且与质谱分析兼容的富集技术。

二氧化钛具有富集磷酸丝氨酸（pSer）、磷酸苏氨酸（pThr）和磷酸酪氨酸（pTyr）残基的选择性亲和力。TiO₂磁珠是一种专有的磁性材料微粒载体，能在复杂生物样品的蛋白消化物中简单、方便、高效、高特异、高重复性富集磷酸化肽。磁珠表面的TiO₂纳米粒子对于单磷酸化肽和多磷酸化肽没有明显的偏好，因而非常适合单步富集磷酸化肽用于基于质谱的蛋白质组学分析。另外，TiO₂磁珠还可以通过结合磷脂双层膜分离外泌体等细胞外囊泡（EVs）。TiO₂通过和EVs双层磷脂的磷酸基形成双齿结构捕获EVs，磁性内核能进一步将磁珠EVs复合物进行分离。磁珠和EVs的结合是可逆的，通过碱性溶液清洗，便能洗脱和收集所捕获的EVs。

南京东纳生物科技有限公司生产的5微米二氧化钛磁珠（薄壳层）为尺寸均一的单分散微米级磁珠，表面呈现纳米级粗糙度岛状结构，具较高的比表面积，较强的饱和和磁化强度，快速的磁响应时间等优点。二氧化钛磁珠集合了磁性材料快速外磁场响应和金属氧化物稳定性的优点，具有很高的比表面积，简化了磷酸化多肽富集过程，提高了富集通量。

【产品参数】

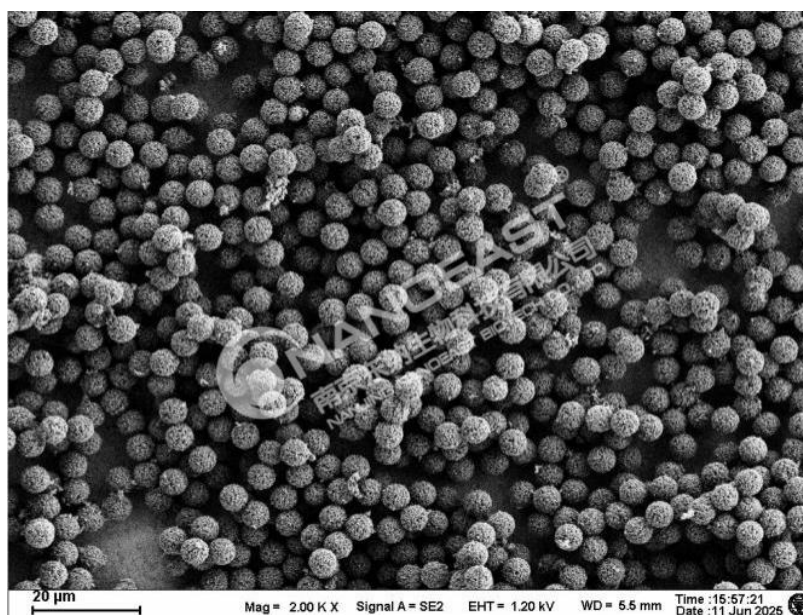


图 1.5 微米二氧化钛磁珠（薄壳层）扫描电镜照片

【产品信息】

浓度	25 mg/mL
粒径	5 μm
表面电位	-20 mV 左右
磁含量	大约 10%-15%
保存条件	密封, 4°C/36 个月, 禁止冷冻, 使用前请充分混匀
包装	塑料瓶

【产品特点】

1. 对磷酸化肽高特异性;
2. 对单磷酸化肽和多磷酸化肽无明显的偏好;
3. 小于 30 s 的快速磁响应性, 减少样品损失, 更适合自动化操作;
4. 抗氧化特性, 降低样品被污染风险。

【使用案例】

血浆外泌体提取

1 血浆样本收集

- 1.1 空腹静脉采血, 弃去前 2-3 mL 血液, 静脉采血后收集至 EDTA 抗凝管 (含有 K_2EDTA 抗凝剂) 中。收集完毕后, 将抗凝管轻轻倒转 8-10 次;
- 1.2 采集后半小时内, 将样品离心 10 min, 室温, 1000 g;
- 1.3 离心完毕后, 轻轻吸取分界面 0.5 cm 以上的浅黄色血浆至新无酶离心管中, 留下约 0.5 cm 的血浆在分界面缓冲层之上, 不要扰动分界面避免污染;
- 1.4 将新无酶离心管中的样品离心 10 min, 室温, 2500 g;
- 1.5 第二次离心后, 弃掉底部 20 μL 的血浆, 将血浆上方部分重新转移至新的离心管中;
- 1.6 将新离心管移入 -80 °C 冰箱内保存。

2 基于二氧化钛磁珠的血浆胞外囊泡提取

- 2.1 将 50 μL 血浆分散于 950 μL 的 HEPES 缓冲液中 (10 mM, pH=7.4), 小心吹打避免气泡;
- 2.2 加入 100 μL 0.1% NP40/Triton X-100 溶液 (m/V), 吹打混匀;
- 2.3 直接加入 20 μL (0.5 mg 磁珠, 如需保证完全捕获, 可以加大磁珠用量) 磁珠溶液, 充分混匀后, 将混合物孵育 20 分钟以确保充分捕获;
- 2.4 磁分离纯化样本, 用 1 mL 0.01% NP40/Triton X-100 溶液洗涤一次, 再用 1 mL HEPES 缓冲液洗涤两次, 弃去上清液;
- 2.5 用 HEPES 缓冲液稀释的磁珠-胞外囊泡复合物可用于进一步分析。

3 外泌体的洗脱

洗脱过程: 将磁珠与外泌体复合物置于 37°C 振荡器中, 加入到 400 μL 含有 10% 氨水的 PBS 溶液 (10 mM PBS 用 25% 的氨水进行调节至 pH 为 11.1, PBS 中氨水的含量为 10%) 中孵育 10 分钟, 以确保外泌体从磁珠上充分释放。随后, 快速进行磁分离, 通过超滤系统 (30 kDa) 将上清液中的洗脱液溶液替换为保存液, 并用保存液洗涤 3 次。通过纳米颗粒跟踪分析技术, 来验证洗脱效率。

4 基于二氧化钛磁珠的胞外囊泡提取效率评估

若需理论评估二氧化钛磁珠对胞外囊泡的提取效率，需使用提前纯化后的纯净胞外囊泡样本。根据国际胞外囊泡协会（ISEV）的建议，本方案统一采用超速离心法（UC）进行胞外囊泡的提取与纯化。

参考步骤如下：

- 4.1 收集经无血清培养基（或已通过离心等方法预先消耗了所有胞外囊泡的培养基）培养 48—72 h 的细胞培养基；
- 4.2 200 g，室温离心 10 min，收集上清，去除培养基内的细胞；
- 4.3 2000 g，室温离心 15 min，收集上清，去除细胞碎片；
- 4.4 10000 g，室温离心 60 min，收集上清，去除大尺寸的碎片与颗粒；
- 4.5 140000 g，4℃离心 90 min，弃上清，收集的沉淀即为粗提的胞外囊泡。将沉淀用 HEPES 缓冲液（或 1 × PBS 缓冲液）分散，反复吹打，确保沉淀充分重悬混匀；
- 4.6 140000 g，4℃离心 90 min，弃上清，去除杂蛋白吸附，重悬收集沉淀，保存至-80℃备用。
- 4.7 通过纳米粒子示踪分析（NTA）进行胞外囊泡计数，NTA 使用前需要使用标准颗粒校正，胞外囊泡需要预先稀释到合适的浓度，确保一个视野中的颗粒不超过上限。
- 4.8 计数后的胞外囊泡与 200 μL 的二氧化钛磁珠（用量可变）室温共孵育 10 min（时间可变），磁分离，收集上清；
- 4.9 收集的上清液再次通过 NTA 计数，通过以下公式评估捕获效率：

$$\text{捕获效率} = (F_0 - F_1) / F_0 \times 100\%$$

其中 F_0 为与磁珠共孵育前胞外囊泡的数量， F_1 为与磁珠共孵育后上清液中胞外囊泡的数量。

- 4.10 向磁珠-胞外囊泡复合物中加入 10%氨水的 PBS 溶液（10 mM PBS 用 25%的氨水进行调节至 pH 为 11.1，PBS 中氨水的含量为 10%）重悬，37℃震荡 10 min，再次进行磁分离，收集上清液，分为以下两部分使用。
 - a. 通过 Western blot 鉴定胞外囊泡的代表性标志物（CD9/63/81，TSG101）与纯度（Calnexin，ApoB）。亦可通过蛋白浓度与 NTA 得到的颗粒数比值（蛋白/颗粒数）进行鉴定，不作详细介绍。
 - b. 通过透射电子显微镜评估胞外囊泡形态与尺寸，胞外囊泡需使用 2%磷钨酸染色液负染。

注：氨水具有腐蚀性，请参照安全使用说明操作。

【包装】

塑料瓶。

【贮藏及有效期】

密封，2-8℃冰箱储存，有效期 3 年。

【注意事项】

1. 二氧化钛磁珠长期静置会发生沉降，请在充分搅拌或震荡分散混匀后使用。
2. 密封，2-8℃冰箱储存，避免干燥成块，避免冻融。

【生产单位】

公司名称 南京东纳生物科技有限公司
地 址 南京市江宁区龙眠大道 568 号南京生命科技小镇北区 5 号楼 6 楼
邮政编码 210000
电话号码 025 8347 5811
电子邮箱 marketing@nanocast.net

