

# 产品说明书

## PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti-mouse IgG POD)

外泌体的表面或者内部含有蛋白质、mRNA、microRNA、DNA等，从细胞分泌后，稳定存在于血液、尿液、唾液、母乳等体液中。其中细胞间信号传递和疾病生物标记的功能很受关注。

### ◆测定方法概述

稀释细胞培养上清样本，或者是MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS纯化稀释的细胞外囊泡样品，将它们添加到Exosome Capture 96 Well Plat (PS结合蛋白包被微孔板)微孔中，一边搅拌微孔一边在室温下孵育2小时。清洗后，添加作为检测用一抗反应液，即可识别任意细胞外囊泡表面标记蛋白的小鼠单抗或者试剂盒附加的Control Primary Antibody Anti-CD63反应液，边搅拌边在室温下孵育1小时，清洗后，添加作为检测用二抗反应液的Secondary Antibody HRP-conjugated Anti-mouse IgG，边搅拌边在室温下孵育1小时，清洗后添加TMB Solution (显色液)后在室温下反应30分钟，添加终止液后，在450nm (副波长620nm处)检测吸光值。请比较各样本测定值。利用本试剂盒定量测定时，以MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS纯化的细胞外囊泡 (事前测定蛋白质浓度或粒子数)作为标准品，通过对梯度浓度标准品的吸光度测定制作标准曲线。通过该曲线计算出样本中外泌体浓度。

### 1. 试剂盒保存和使用期限

请将试剂盒保存在2-8℃ (禁止冷冻保存)。在这种保存条件下到试剂盒有效期内是很稳定的 (有效期在标签)。请不要使用过保质期的试剂。开封的各试剂，可能由于保管状态会受到影响，所以请尽早使用。

### 2. 试剂盒拆分后各试剂的保存方法

- (A) Exosome Capture 96 Well Plat  
平板条带拆使用时，剩余未使用的条带需装回拉链密封包装，在2-8℃下保存，有效期内稳定。
- (B) Reaction / Washing Buffer(10×)  
待溶剂恢复到室温下分装必需量后，剩余溶液拧紧瓶盖，在2-8℃保存，有效期内稳定。
- (C) Exosome Binding Enhancer(100×)  
待溶剂恢复到室温下分装必需量后，剩余溶液拧紧瓶盖，在2-8℃保存，有效期内稳定。
- (D) Control Primary Antibody Anti-CD63(100×)  
从冷藏室取出及时分装必需量的溶液后，剩余溶液拧紧瓶盖，在2-8℃保存，有效期内稳定。
- (E) Secondary Antibody HRP-conjugated Anti-mouse IgG(100×)  
从冷藏室取出及时分装必需量的溶液后，剩余溶液拧紧瓶盖，在2-8℃保存，有效期内稳定。
- (F) TMB Solution  
从冷藏室取出及时分装必需量的溶液后，剩余溶液拧紧瓶盖，在2-8℃保存，有效期内稳定。
- (G) Stop Solution  
从冷藏室取出及时分装必需量的溶液后，剩余溶液拧紧瓶盖，在2-8℃保存，有效期内稳定。

### 3. 试剂盒外必需试剂・清单

- 纯净水 (蒸馏水)
- 任意细胞外囊泡表面标记检测用一抗 (人CD63检测用抗体除外)  
推荐产品  
CD9 Antibody(HI9a) (Novus Biologicals, LLC:NB100-77915)  
CD81 Antibody(M38) (Novus Biologicals, LLC:NBP1-44861)
- MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (Code No.:293-77601) (标准品制作)

## 4.必需的器材·清单

- 样本、抗体稀释用软管
- 反应/清洗液配制用玻璃器皿（量筒等）
- 微量移液管
- 连续分装移液管或者8连分装移液管（如果有是最好）
- 一次性槽（8连分装需要用的）
- 纸巾等吸水性物品（清洗后吸取残留在板孔液体）
- 旋涡混合器
- 旋转微孔板振荡器（约500rpm）
- 96微孔板清洗机（如果有最好）
- 96微孔板光度计（可测定 $450\pm 10\text{nm}$ 和 $600\text{-}650\text{nm}$ 的吸光度）
- 数据处理软件

## 5.细胞外囊泡标准品制作（定量测定情况）

利用MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS，按照试剂盒说明书，从样本中纯化细胞外囊泡。纯化的细胞外囊泡可通过BCA法测定蛋白质浓度，可通过纳米追踪分析法（使用纳米位点LM-10等）测定粒子数<sup>※1</sup>。纯化细胞外囊泡请保存在冷藏中<sup>※2</sup>。

※1 各测定实验请根据适当的实验操作手册进行。

※2 冻存融解可能对外囊泡的反应性有所影响，所以请在冷藏条件下保存。

## 6.试剂的配制

试剂盒组成试剂显示“直接使用”的试剂在恢复到室温即可使用。“配制后使用”的试剂请根据下文要求配制。

### 反应/清洗液（1×）配制

Reaction/Washing Buffer(10×)<sup>※3</sup>恢复到室温后用蒸馏水稀释10倍后，根据稀释液容量添加其1/100容量的Exosome Binding Enhancer(100×)<sup>※4</sup>，混合均匀<sup>※5</sup>。

※3 Reaction/Washing Buffer(10×)在冷藏保管条件下可能会析出成分，因此需要恢复到室温后，确认析出物消失方可使用。

※4 Exosome Binding Enhancer(100×)因其为细胞外囊泡结合在平板必需成分，请务必添加。

※5 添加Exosome Binding Enhancer(100×)后的反应/清洗液（1×）成分易析出，请在配制后8小时内使用。

（例）96孔反应成分配制情况

将900mL蒸馏水添加至100mL的Reaction/Washing Buffer(10×)中，再向混合物中添加10mL的Exosome Binding Enhancer(100×)，混合均匀。

### 检测用对照一抗CD63抗体反应液的配制（测定作为表面抗体的人CD63情况）

根据反应/清洗液（1×）容量添加其1/100容量的Control Primary Antibody Anti-CD63(100×)，混合均匀。

（例）96孔反应成分配制情况

向10mL的反应/清洗液（1×）添加100 μL的Control Primary Antibody Anti-CD63(100×)，混合均匀。

### 检测用一抗反应液的配制（测定人CD63以外的表面抗原情况）

识别任意细胞外囊泡表面蛋白的小鼠单抗用反应/清洗液（1×）稀释到适当浓度。检测用一抗反应液的抗体浓度值在200-500ng/mL。

（例）用检测用一抗（1mg/mL）配制96孔反应成分-检测用一抗反应液（250ng/mL）情况

向5μL检测用一抗（1ng/mL）添加195μL的反应/清洗液（1×）混合后，制成40倍稀释液。然后向9.9mL的反应/清洗液（1×）添加100μL的40倍稀释液，混合均匀。

### 检测用二抗反应液的配制

根据反应/清洗液（1×）容量添加其1/100容量的Secondary Antibody HRP-conjugated Anti-mouse IgG(100×)，混合均匀。

(例) 96孔全部使用情况

向10mL的反应/清洗液(1×)添加100 μL的Secondary Antibody HRP-conjugated Anti-mouse IgG(100×), 混合均匀。

### 用于标准曲线制作的细胞外囊泡标准品稀释梯度的配制(定量测定情况)

按照3.中制作的细胞外囊泡标准品通过ELISA测定的450nm处吸光度(减去副波长620nm处吸光度)在0.1-3.0范围内制定稀释梯度, 用反应/清洗液(1×)<sup>※6</sup>稀释成相应浓度。

(例) 细胞外囊泡标准品(蛋白质浓度20μg/mL), 从20ng/mL开始, 按照每2倍稀释的7个梯度配制情况

(1) 细胞外囊泡标准品(蛋白质浓度20μg/mL) 5μL和反应/清洗液(1×) 45μL混合, 配制外囊泡10倍稀释液(2000ng/mL)。

(2) 按下表所示比例和反应/清洗液(1×)混合, 从20ng/mL开始, 按照每2倍稀释的7个梯度配制。

标准溶液浓度 (ng/mL)	标准溶液的容量	反应/清洗液(1×)
20	10倍稀释液(2000ng/mL): 5μL	495μL
10	20.0ng/mL标准溶液: 250μL	250μL
5	10.0 ng/mL标准溶液: 250μL	250μL
2.5	5.00 ng/mL标准溶液: 250μL	250μL
1.25	2.50 ng/mL标准溶液: 250μL	250μL
0.625	1.25 ng/mL标准溶液: 250μL	250μL
0.313	0.625 ng/mL标准溶液: 250μL	250μL
0.00 (Blank)	-	250μL

## 7. 样本的稀释

在软管等器皿中用反应/清洗液(1×)<sup>※6</sup>稀释样本在ELISA测定的450nm处吸光度(减去副波长620nm处吸光度)在0.2-2.5范围内。

※6 请用6.中制备的已添加Exosome Binding Enhancer的反应/清洗液(1×)稀释细胞外囊泡标准品以及样本。其他, 向TBS添加浓缩成1×的Exosome Binding Enhancer, 请不要向PBS添加浓缩成1×的Exosome Binding Enhancer, 防止产生析出物。

## 8. 操作方法

下文提及各清洗步骤中试剂按6.中配制方法提前准备好。

- (1) Exosome Capture 96 Well Plat(分条带)的各孔平均用反应/清洗液(1×) 300-350μL清洗三遍, 然后, 反复倒盖在纸巾上, 轻轻叩打, 去除残留液。
- (2) 样本稀释液、标准品稀释液(定量测定情况), 作为空白对照的反应/清洗液(1×) 每孔分别注入100μL。
- (3) 贴上平板膜<sup>※7</sup>, 微孔板振荡器约500rpm边搅拌边在室温下(20-25°C)反应2小时<sup>※8</sup>。
- (4) 反应完毕后, 弃去反应液, 各孔平均用反应/清洗液(1×) 300-350μL清洗三遍, 然后, 反复倒盖在纸巾上, 轻轻叩打, 去除残留液。
- (5) 将检测用对照抗CD63抗体反应液或任意检测用一抗反应液, 每孔分别注入100μL。
- (6) 贴上平板膜<sup>※7</sup>, 微孔板振荡器约500rpm边搅拌边在室温下(20-25°C)反应1小时<sup>※8</sup>。
- (7) 反应完毕后, 弃去反应液, 各孔平均用反应/清洗液(1×) 300-350μL清洗三遍, 然后, 反复倒盖在纸巾上, 轻轻叩打, 去除残留液。
- (8) 将检测用二抗反应液, 每孔分别注入100μL。
- (9) 贴上平板膜<sup>※7</sup>, 微孔板振荡器约500rpm边搅拌边在室温下(20-25°C)反应1小时<sup>※8</sup>。

- (10) 反应完毕后，弃去反应液，各孔平均用反应/清洗液（1×）300-350μL清洗五遍，然后反复倒盖在纸巾上，轻轻叩打，去除残留液。
- (11) 每孔分别注入恢复到室温的TMA溶液100μL，微孔板振荡器搅拌1分钟。
- (12) 贴上平板膜<sup>※7</sup>，室温下（20-25℃）静置30分钟。
- (13) 每孔分别注入恢复到室温的终止溶液100μL。
- (14) 微孔板振荡器搅拌5秒钟后，迅速在96微孔板光度计450nm处和副波长620nm（600-650nm）<sup>※9</sup>的吸光度测定。

※7 平板条带拆分使用情况，请根据条带尺寸配比裁剪平板膜。

※8 因在静止条件下反应的检测灵敏度低，孔间误差较大，所以推荐在旋转式微孔板振荡器500rpm搅拌下反应。

※9 副波长在600-650nm的范围内使用。

## 9.计算

以下计算使用的450nm处吸光值是副波长620nm处（600-650nm）<sup>※9</sup>的吸光度的相减值。

### <定性测定情况>

稀释样本的450nm处吸光值减去空白对照的450nm处吸光值，请在样本间比较。

### <定量测定情况>

- (1) 稀释样本的450nm处吸光值减去空白对照的450nm处吸光值即为稀释样本吸光值<sup>※10</sup>。
- (2) 标准品稀释梯度的450nm处吸光值减去空白对照的450nm处吸光值即为标准品吸光值。
- (3) 以X轴为标准品浓度，以Y轴为标准品吸光值制作标准曲线<sup>※11</sup>。
- (4) 根据标准曲线，从各稀释样本吸光值可获得对应的浓度值<sup>※12</sup>。读取的浓度值乘以样本稀释率即为测定值。

※10 如果稀释样本的吸光值超出标准曲线吸光度范围的话，应当适当稀释后再次测定。

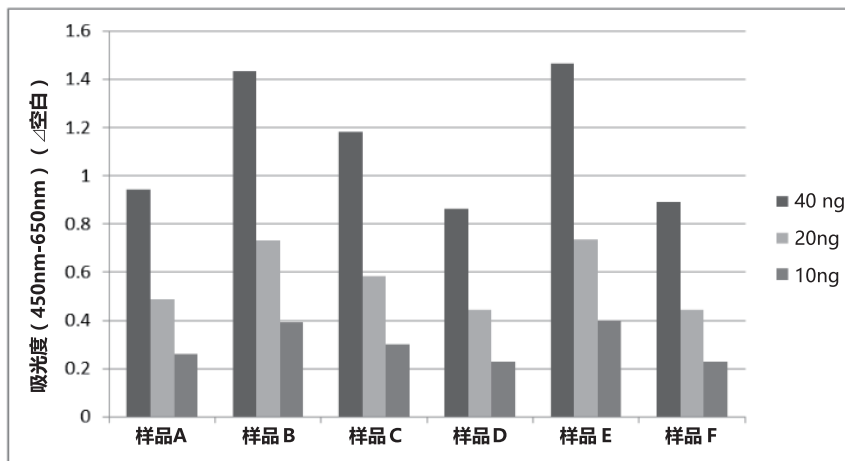
※11 标准曲线请每次测定前制作。

※12 计算机软件处理推荐使用三阶多项式，4或5参数。

## 10.试剂盒性能参考数据

### (1) 正常人血清纯化细胞外囊泡定性分析

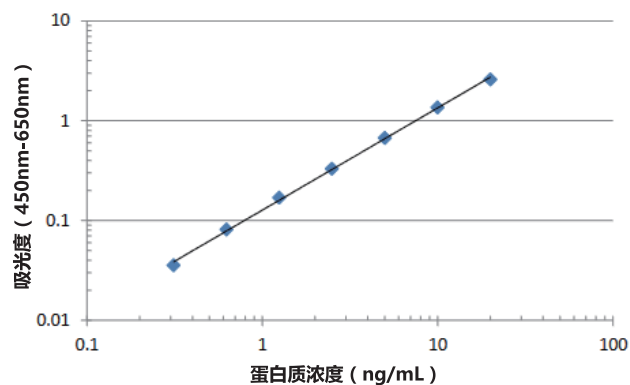
将从正常人血清的6个样本纯化的细胞外囊泡40、20、10ng分别添加到孔中，用可识别表面标记CD63的对照检测一抗进行定性比较。





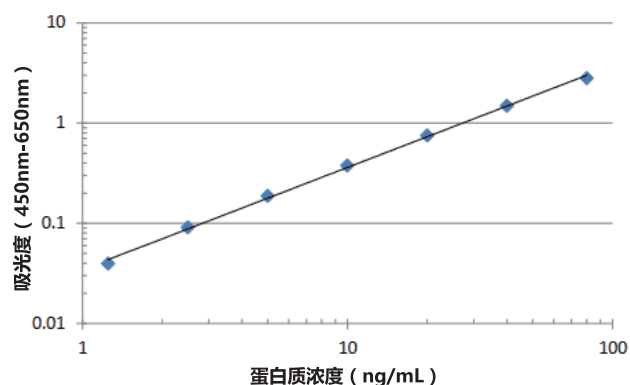
(2) 细胞培养上清纯化细胞外囊泡标准曲线 (Standard curve) 参考数据  
以COLO201细胞培养上清纯化外囊泡的标准曲线为例 (抗CD63抗体检测)

浓度 (ng/mL)	吸光度 (450nm-620nm)			
	1	2	平均值	Δ 空白
0	0.051	0.0522	0.0516	-
0.3125	0.0859	0.0882	0.0871	0.0355
0.625	0.132	0.1339	0.133	0.0814
1.25	0.2198	0.2217	0.2208	0.1692
2.5	0.3812	0.382	0.3816	0.33
5	0.7137	0.7307	0.7222	0.6706
10	1.4068	1.406	1.4064	1.3548
20	2.6552	2.6261	2.6407	2.5891



以K562细胞培养上清纯化外囊泡的标准曲线为例 (抗CD63抗体检测)

浓度 (ng/mL)	吸光度 (450nm-620nm)			
	1	2	平均值	Δ 空白
0	0.0462	0.0528	0.0495	-
1.25	0.087	0.0911	0.0891	0.0396
2.5	0.136	0.1446	0.1403	0.0908
5	0.2355	0.2387	0.2371	0.1876
10	0.432	0.4205	0.4263	0.3768
20	0.8192	0.785	0.8021	0.7526
40	1.5618	1.5124	1.5371	1.4876
80	2.9187	2.8005	2.8596	2.8101

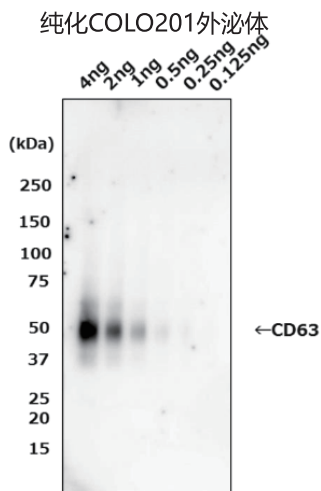


(3) 细胞培养上清纯化外囊泡的检测灵敏度 (Sensitivity) 参考数据

利用各样本中纯化外囊泡在本实验检测灵敏度 (抗CD63抗体检测)

	检测限 (空白+3.3SD)	检测限 (空白+10SD)
COLO201细胞培养物上清	0.11ng/mL (11pg)	0.34ng/mL (34pg)
K562细胞培养物上清	0.50ng/mL (50pg)	1.34ng/mL (134pg)

COLO201细胞培养上清纯化外囊泡免疫印迹实验检测灵敏度 (抗CD63抗体检测)



(4) 细胞培养上清样本的定量分析的正确性 (Precision) 参考数据

实验内部误差 (抗CD63抗体检测)

以COLO201细胞以及K562细胞培养上清纯化外囊泡为标准品制作标准曲线, K562细胞的4个梯度稀释样本 (1:100-1:800) 以及 COLO201细胞的4个梯度稀释样本 (1:200-1:1,600) 的浓度进行测定 (n=6), 求取测定值的CV (%)。

COLO201细胞培养上清 (稀释比例)	测定值 (ng / mL)									
	1	2	3	4	5	6	平均值	SD	CV (%)	
1 : 1600	1.18	1.17	1.16	1.17	1.15	1.14	1.16	0.01	1.3	0.7
1 : 800	2.31	2.32	2.32	2.3	2.31	2.32	2.31	0.01	0.4	
1 : 400	4.82	4.78	4.77	4.78	4.81	4.78	4.79	0.02	0.4	
1 : 200	9.94	9.89	9.76	9.85	9.77	9.96	9.86	0.09	0.9	

K562细胞培养上清 (稀释比例)	测定值 (ng / mL)									
	1	2	3	4	5	6	平均值	SD	CV (%)	
1 : 800	3.93	3.88	3.88	3.83	3.78	3.86	3.86	0.05	1.3	2
1 : 400	7.71	7.82	7.64	7.64	7.48	7.46	7.62	0.13	1.8	
1 : 200	15.47	14.89	15.32	15.32	14.85	14.69	15.09	0.32	2.1	
1 : 100	32.03	31.77	31.21	31.59	30.31	30.03	31.16	0.82	2.6	

实验间误差 (抗CD63抗体检测)

以COLO201细胞以及K562细胞培养上清纯化外囊泡为标准品制作标准曲线, K562细胞的4个梯度稀释样本 (1:100-1:800) 以及 COLO201细胞的4个梯度稀释样本 (1:200-1:1,600) 的进行3次不同浓度测定, 求取测定值的CV (%)。

COLO201细胞培养上清 (稀释比例)	测定值 (ng / mL)						
	1	2	3	平均值	SD	CV (%)	
1 : 1600	1.09	1.07	1.12	1.09	0.02	2.1	1.8
1 : 800	2.13	2.13	2.19	2.15	0.03	1.6	
1 : 400	4.26	4.39	4.42	4.36	0.09	2	
1 : 200	8.65	8.8	8.96	8.81	0.16	1.8	

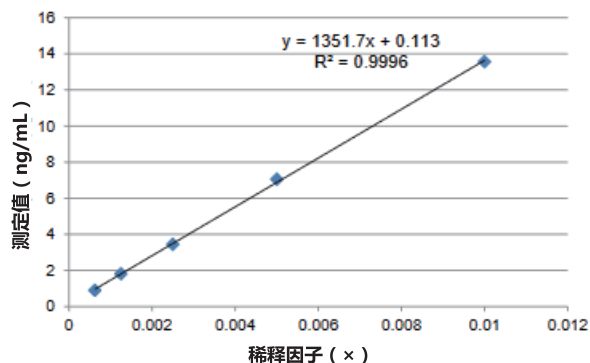
K562细胞培养上清	测定值 (ng / mL)						
	1	2	3	平均值	SD	CV (%)	
1 : 800	3.1	3.3	4.09	3.5	0.52	15	8.9
1 : 400	6.53	6.76	7.45	6.91	0.48	6.9	
1 : 200	13.44	14.53	15.27	14.41	0.92	6.4	
1 : 100	27.09	29.19	31.34	29.21	2.12	7.3	

(5) 细胞培养上清样本的稀释线性性 (Linearity) 参考数据

COLOC201细胞以及K562细胞的培养上清纯化外囊泡为标准品制作标准曲线, 以COLO201细胞培养上清5个梯度稀释样本 (1:100-1:1,600), K562细胞培养上清5个梯度稀释样本 (1:50-1:800), 对其稀释线性性进行评估。

COLO201细胞培养上清样品的稀释线性性 (抗CD63抗体检测)

稀释		测定值 (ng/mL)	期望值 (ng/mL)	预期的百分比
比率	稀释因子 (x)			
1 : 1600	0.000625	0.89	0.91	98.4
1 : 800	0.00125	1.82	1.72	105.6
1 : 400	0.0025	3.44	3.52	97.8
1 : 200	0.005	7.04	6.78	103.9
1 : 100	0.01	13.6	-	-



(6) 细胞培养上清样本添加回收 (Recovery) 参考数据

COLO201细胞培养上清样品1:400稀释样本添加回收

向COLO201细胞培养上清的稀释样本 (1:400) 添加COLO201细胞培养上清纯化的3个浓度 (2.5/5/10ng/mL) 的外囊泡, 进行样本浓度检测, 求得回收率。

COLO201培养上清稀释液 (1:400)

尖峰值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	恢复值 (ng/mL)	恢复率 (%)	
-	4.23	-	-	
2.5	7.03	2.81	112.2	104
5	9.19	4.96	99.2	
10	14.3	10.1	100.5	

K562细胞培养上清样品1:200稀释样本添加回收

向K562细胞培养上清的稀释样本 (1:200) 添加K562细胞培养上清纯化的3个浓度 (10/20/40ng/mL) 的外囊泡, 进行样本浓度检测, 求得回收率。

K562培养上清稀释液 (1:200)

尖峰值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	恢复值 (ng/mL)	恢复率 (%)	
-	14.3	-	-	
10	24.6	10.3	103	99
20	33.8	19.5	97.5	
40	53.4	39.1	97.8	

## 11. 注意事项

- (1) 在操作本试剂盒之前请准备好手套、眼镜、防护服等。
- (2) 试剂类请不要沾到皮肤上。本试剂盒试剂一旦溅到眼睛、口腔、伤口、皮肤等处，要采取急救方式，如用自来水彻底冲洗，必要时请就医。
- (3) 请充分注意一些具有感染危险性的样本。本试剂盒含有动物源成分。
- (4) 使用完的样本，使用过的消耗品等需要在1%福尔马林，2%戊二醛，或次氯酸钠溶液（超过0.1%）中浸泡一小时以上。或者用高压灭菌锅处理后废弃。使用过的消耗品和未使用的药品请遵循所属设施的规定以及各地区法规进行废弃。
- (5) 各步骤反应时，为防止板孔干燥、混入异物、温度偏差、分装试剂蒸发，有必要贴上平板膜。
- (6) ELISA法会根据测定环境而受到影响。测定操作、反应场地的室温：请严格保证在20-25℃（试验台或者孵化器内温度）。另外，请避免在风速（也包含空调风）、低湿度的环境下测定。
- (7) 请注意孔间污染。

Wako

和光純薬工業株式会社

boppard

宝柏·中国



1703WABU01

北京 Tel: 010 85804838  
上海 Tel: 021 62884751  
广州 Tel: 020 87326381  
香港 Tel: 852 27999019  
Email: info@boppard.cn