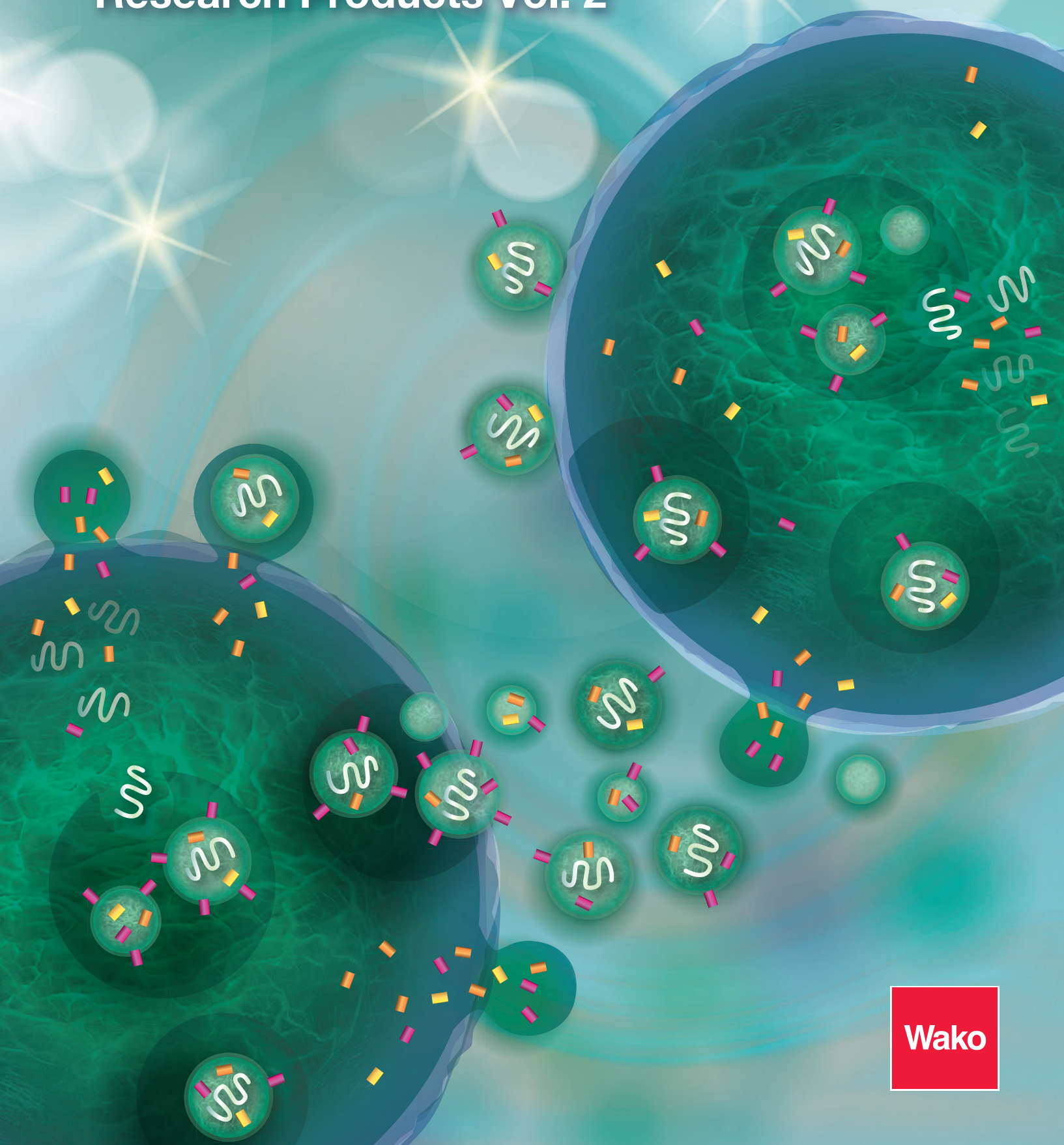


Exosome

Research Products Vol. 2



目录

1. 综述	1	• COLO201来源纯化外泌体的加标回收实验[EpCAM]	24
• 何谓外泌体		• 确认去外泌体血清中残留的细胞外囊泡	24
2. PS亲和法	3	• 应用于糖链分析: rBC2LCN 凝集素和 Tim4 双抗夹心 ELISA	25
3. MagCapture™ 外泌体提取试剂盒 PS	6	• 与聚合物沉淀法比较回收效率	25
• 产品概要及特点		7. PS Capture™ 外泌体流式试剂盒	26
各种样品的预处理操作	7	• 产品概要及特点	
应用数据		应用数据	
• 从培养上清样品中提取细胞外囊泡的分析	8	▷ 分析K562细胞培养上清中外泌体的表面抗原	27
▷ 利用NanoSight分析外泌体	8	▷ 分析COLO201细胞培养上清、人血清、人血浆(EDTA血浆、肝素血浆)所含外泌体表面抗原	27
▷ 利用透射电子显微镜分析外泌体	9	8. 外泌体标记抗体	28
▷ 从K562细胞培养上清提取的外泌体回收量和纯度的比较(无血清培养基)	9	• 产品概要及特点	
▷ 从K562细胞培养上清提取外泌体的回收量和纯度的比较(含10%去外泌体FBS的培养基)	10	▷ 抗CD63, 单克隆抗体(3-13)	28
• 分析从血清、血浆、尿液样品中提取的细胞外囊泡	11	▷ 抗CD63, 单克隆抗体(3-13), 荧光素结合	29
▷ 比较从人血清中分离的外泌体的回收率	11	▷ 抗CD63, 单克隆抗体(3-13), 红色荧光色素(635)结合	29
▷ 从人EDTA血浆样品中分离外泌体	11	▷ 抗CD9, 单克隆抗体(1K)	30
▷ 比较从人尿液样品中分离的外泌体的回收量	11	▷ 抗CD81, 单克隆抗体(17B1)	31
• 比较健康人血清来源外泌体中microRNA和mRNA的回收率	12	9. EV-Save™ 细胞外囊泡封闭试剂	32
• 外泌体蛋白质组学分析	13	• 产品概要及特点	
• Protein Assay BCA Kit检测外泌体的蛋白质浓度	14	▷ EV-Save™ 的吸附抑制效果-样品管-	32
• 外泌体的标记和Hela细胞摄取实验	15	▷ EV-Save™ 的吸附抑制效果-同时使用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS-	33
4. PS亲和法在ELISA的应用	16	▷ EV-Save™ 的冷冻保护作用	33
5. PS Capture™ 外泌体 ELISA 试剂盒(抗小鼠 IgG POD)	17	10. Q&A·疑难解答	34
• 产品概要及特点		• MagCapture™ 外泌体提取试剂盒 PS	34
应用数据		• PS Capture™ 外泌体流式试剂盒	36
• 从各种细胞培养上清提取细胞外囊泡的定性分析	18	• PS Capture™ 外泌体ELISA 试剂盒(抗小鼠 IgG POD)	36
• 从正常人血清中提取的细胞外囊泡的定性分析	19	• PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒(链霉亲和素HRP)	36
• 从细胞培养上清中提取细胞外囊泡的稀释线性(Linearity)参考数据	19	12. 相关产品	38
• 检测不同接种细胞数和不同培养时间的培养基中的细胞外囊泡	20	• MagCapture™ 系列用磁珠捕获磁力架	38
• 添加药物后引起细胞外囊泡数量的变化	20	• UniWells™ 水平连接细胞共培养板	38
• COLO201细胞培养上清来源和人血清来源的外泌体灵敏度检测比较	21	▷ 水平培养的优点	39
6. PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒(链霉亲和素HRP)	22	▷ 应用实例	39
• 产品概要及特点		▷ 使用方法和规格	40
应用数据		▷ 疑难解答	41
• 血液样品以及培养上清样品的稀释线性	23	13. 产品列表	41
• PS亲和法和抗体法捕获能力的比较	23		

何谓外泌体

金泽大学医学系免疫学 教授

華山 力成



近年来,细胞外囊泡(EV)研究正加速发展。2011年有约200篇相关论文发表,但2016年一年就有1000篇以上的相关论文发表,论文内容涉及各种生理功能和病理症状。EV大致可分为核内体来源的外泌体和细胞膜来源的微囊泡,但即便是用现在提取精度最高的差速离心法也难以将二者明确分离,所以简单地将 $10,000\times g$ 离心后未沉淀的EV称为small EV(主要是外泌体)¹⁾。外泌体是由各种细胞分泌的小型膜囊泡(直径30~100nm),存在于大多数体液(如血液、尿液、髓液等)和细胞培养液中。外泌体是由脂质双分子层包被的膜囊泡,产生于称为多囊泡胞内体的胞内囊泡中,多囊泡胞内体通过与细胞膜融合将外泌体释放到细胞外。外泌体含核内体来源的蛋白质(如ESCRTs等)和细胞内运输相关蛋白(如Rab GTPase等)、以及细胞膜来源蛋白(如CD63、CD81等)等为代表的各种内分泌细胞来源的蛋白和RNA,同时还含分泌细胞细胞膜来源和内体膜来源的脂质(如胆固醇和鞘磷脂等)²⁾。多年来研究人员认为外泌体的作用是参与细胞内废弃物的排放。但是近年来外泌体在生物体内作为运载脂质、蛋白质、RNA等细胞间信息传递的新型媒介,倍受瞩目。除了阐明外泌体生理或病理功能外,面向于临床应用的功能研究也迅速发展,尤其是诊断、治疗和生物标记物开发等。

现在,外泌体研究横跨几乎所有的研究领域(免疫、神经系统、肿瘤、内分泌、循环系统等)。例如,免疫细胞来源的外泌体含有抗原肽/MHC复合体和各种抗原,可能控制着免疫细胞间抗原信息的交换、免疫细胞活化、非活化等各种免疫应答机制³⁾。外泌体在神经系统中与神经回路的控制相关,同时各种神经退行性疾病的致病蛋白还可以通过外泌体释放到细胞外并传递到其他细胞,与病情发展密切相关⁵⁾。癌细胞释放的外泌体含有大量与血管新生和免疫抑制相关的分子,构建适合癌细胞生长的微环境,促进癌细胞的发展⁶⁾。另外,癌细胞来源的外泌体上的粘着分子表达形式决定着癌症向器官的转移途径⁷⁾。最近,有报告指出脂肪细胞释放的外泌体对肝脏的遗传基因表达有控制作用⁸⁾。许多病毒利用外泌体的产生路径感染细胞,受病毒感染的细菌和寄生虫通过外泌体控制其他受细胞感染的细菌、寄生虫的活动^{9、10)}。

上述这些功能几乎都是通过细胞分泌到外泌体中的分子引起的。其中有分泌细胞来源的外泌体内含mRNA和miRNA的发现,使外泌体与细胞间遗传信息表达水平,和传递的相关性倍受瞩目¹¹⁾。

这些RNA被外泌体的脂质双分子层膜所保护,不会被RNase所降解,可以在血液和体液中稳定存在。被靶细胞吞噬的外泌体通过与内体膜融合,将RNA释放到靶细胞的细胞质中。释放出来的mRNA翻译为蛋白质,但miRNA抑制目的基因的翻译,因此外泌体在靶细胞内调控基因的表达。一个外泌体所含蛋白质有数万种,mRNA、miRNA的种类有数千种以上,它们的结构除了受来源细胞不同影响外,还受到细胞状态不同的影响。另外,外泌体中这些物质的结构与它们在分泌细胞内的结构不同,所以可能存在一种外泌体特异蛋白和mRNA/miRNA选择性积累的机制。这种特异性可将外泌体内的RNA作为生物标记,更进一步作为治疗开发的靶点。外泌体中的mRNA一旦被靶细胞吞噬,可能引发这个细胞内的功能性蛋白的表达,但外泌体中多数的miRNA是前体而非功能性miRNA,这些miRNA具有何种生理性意义,学者们还在积极研究。由于外泌体含有各种蛋白质、RNA和脂质,研究人员正将其按细胞进行分类汇总,以建立数据库——ExoCarta。此外,在世界各地分别运用蛋白质组学、转录组学和系统生物学进行大规模分析工作,而FunRich的EV plugin已成为一种通用的分析手段。今后,在推进外泌体研究方面,各领域的研究人员信息共享至关重要。

运用外泌体进行治疗和诊断的功能开发

随着外泌体的功能性日渐清晰,近年来,越来越多研究着眼于基于外泌体功能的治疗方法。例如,血液中的成纤维细胞(一种间充质祖细胞群)所释放的外泌体,可以通过促进角质细胞的迁移和增殖,以及血管新生来促进伤口愈合。有报导指出,外泌体内miRNA参与促进血管新生、抗炎性和促进胶原蛋白沉淀等一系列过程¹²⁾。从癌症患者树突状细胞中释放的外泌体含有各种癌症细胞来源的蛋白质,可以强化杀伤性T细胞对癌症细胞的特异性反应。利用此功能的抗肿瘤免疫疗法,目前正处于初期临床研究阶段¹³⁾。另一方面,也有研究尝试利用外泌体的功能抑制发病机制。例如,类风湿关节炎患者的滑膜成纤维细胞所释放的外泌体,所释放的外泌体中,聚集了高浓度的诱导细胞死亡的TNF- α ,可使类风湿关节炎恶化¹⁴⁾。通过上述介绍可以知道癌症细胞来源的外泌体含有与癌症进展相关的分子,神经细胞来源的外泌体含有与神经退行性疾病相关的分子,因此,通过抑制或去除这些外泌体,有望抑制疾病发生。随着今后的研究发展,对外泌体功能逐步清晰,并扩大临床应用,有望将外

泌体应用在各种疾病治疗上。甚至可尝试利用外泌体将siRNA和抗癌药剂等运输到目标细胞中。将各种细胞粘着分子表达在外泌体膜表面上,由其形式决定外泌体被运输往哪一种细胞,该特性有望用于开发新型DDS^[15]。

外泌体在体液中十分稳定,同时外囊泡所含的蛋白质和RNA被外泌体的脂质双分子层膜所包被而免于降解。另外在从收集后长期储存的体液中所提取到的外泌体仍然比较完整,因此外泌体有望成为临床检测的新型疾病生物标记。外泌体与各种疾病的相关性已经查明,特别是释放到血液中的癌细胞来源的外泌体成分,与正常细胞来源外泌体成分存在差异性这一点引起了各方兴趣,且已作为癌症早期诊断技术,应用于与癌症进展相关的研究^[16]。甚至人们期望将尿液中的外泌体作为肾脏、前列腺疾病、膀胱疾病的新诊断标记,髓液中的外泌体作为脑内肿瘤和神经退行性疾病的新型标记。

外泌体研究的课题和展望

尽管目前已有许多关于外泌体角色的报导,在这些验证实验中,使用了从体液和培养上清中提取浓缩的高纯度外泌体,但它们在活体内是否真的能发生作用尚未能确定。确认外泌体生理作用的唯一方法就是明确外泌体的释放机制,通过促进或抑制释放机制,分析会引起何种生理作用,这也是进一步研究发展方向。甚至生物体内的外泌体动态(哪个外泌体迁移至何处)也会在今后的研究开发中成为需要努力研究的重要课题。

截止目前为止,外泌体提纯的方法主要有超速离心法和PEG沉淀法试剂盒,但利用这些方法提取的外泌体中混有非常多的杂质,必须慎重分析所获得的实验结果是否真的是通过外泌体本身的成分所起的作用。超离法存在操作繁杂、回收率不稳定、不能用于定量分析、必须使用昂贵的超速离心机、无法进行多样品分析检测等问题。因此外泌体研究相对困难,需要尽快开发可简单提取高纯度外泌体的技术。因此,Wako着眼于巨噬细胞的外泌体受体Tim4,制备出Tim4细胞外域与磁珠结合的“Tim4磁珠”^[17]。Tim4可通过外泌体膜表面的磷脂酰丝氨酸和钙离子的依赖性结合,再经过含有EDTA螯合剂的洗脱缓冲液进行分离,提取高纯度的完整外泌体。实际上,用Tim4亲和法提纯的人白血病细胞释放的外泌体,其提取纯度与超离法和PEG沉淀法提取外泌体做比较,其蛋白特异性检测可高出10~100倍以上,几乎没有外泌体以外的杂蛋白,由此证明可通过本方法可以良好的重复性提取高纯度外泌体。因此,用这个方法可以检测到许多到目前为止无法检测的外泌体蛋白和RNA。利用Tim4的外泌体强结合能力,可用ELISA或FACS高灵敏度检测、定量外泌体。以前无法用差速离心法粗略提纯的微囊泡,通过运用Tim4亲和法,也可提取高纯度的微囊泡。本指导书中有对该技术进行详细说明,我们期待这项技术的可用性今后将受到世界各方好评,有望在外泌体和微囊泡生理功能的分析研究上作出重大贡献。

外泌体的检测和提取所面临的困难之中,其中还有一个就是对各种外泌体的分类方法,研究人员尚未统一定义以何种方法提取的细胞外囊泡可以称之为“外泌体”,给实验数据的分析和重复性确认带来困难。近年,随着国际细胞外囊泡协会(ISEV)的设立、世界性研究者研讨会的形成,国际标准的MISEV指南的提案,计划进行和开始

进行EV研究的研究人员请务必阅读这些方针^[18,19]。另外,建立了各论文实验条件记录的数据库也可作为规避混乱的方法之一^[20]。一方面,随着EV研究倍受世界瞩目,各国启动了大型研究项目。美国启动NIH战略性大型项目Extracellular RNA Communication,国际权威性会议——Gordon会议和Keystone Symposia也从2016年开始成立小组会议。受到欧洲药物研究开发公司“创新药物倡议组织(IMI)”的支持推进的CANCER-ID项目,也包含EV研究在内。2017年日本选定了EV研究为文部科学省研究开发战略的目标之一,期待会加速今后的研究发展。无论如何,今后EV研究的根本就是必须有强有力的研究方法和技术开发,而Tim4亲和法有望成为其中之一。

- 1) Kowal J, *et al.* (2016) Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **113** (8) : E968-977.
- 2) Colombo M, Raposo G, & Thery C (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **30** : 255-289.
- 3) Bobrie A, Colombo M, Raposo G, & Thery C (2011) Exosome secretion : molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, **12** (12) : 1659-1668.
- 4) Bahrini I, Song JH, Diez D, & Hanayama R (2015) Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. *Sci Rep*, **5** : 7989.
- 5) Kramer-Albers EM & Hill AF (2016) Extracellular vesicles: interneural shuttles of complex messages. *Curr Opin Neurobiol*, **39** : 101-107.
- 6) Tkach M & Thery C (2016) Communication by Extracellular Vesicles : Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*, **164** (6) : 1226-1232.
- 7) Hoshino A, *et al.* (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, **527** (7578) : 329-335.
- 8) Thomou T, *et al.* (2017) Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*, **542** (7642) : 450-455.
- 9) Izquierdo-Useros N, Puertas MC, Borrás FE, Blanco J, & Martínez-Picado J (2011) Exosomes and retroviruses : the chicken or the egg? *Cell Microbiol*, **13** (1) : 10-17.
- 10) Regev-Rudzki N, *et al.* (2013) Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell*, **153** (5) : 1120-1133.
- 11) Valadi H, *et al.* (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, **9** (6) : 654-659.
- 12) Geiger A, Walker A, & Nissen E (2015) Human fibrocyte-derived exosomes accelerate wound healing in genetically diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **467** (2) : 303-309.
- 13) Bell BM, Kirk ID, Hiltbrunner S, Gabriellson S, & Bultema JJ (2016) Designer exosomes as next-generation cancer immunotherapy. *Nanomedicine*, **12** (1) : 163-169.
- 14) Zhang HG, *et al.* (2006) A membrane form of TNF-alpha presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death. *J Immunol*, **176** (12) : 7385-7393.
- 15) Batrakova EV & Kim MS (2015) Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release*, **219** : 396-405.
- 16) Thind A & Wilson C (2016) Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J Extracell Vesicles*, **5** : 31292.
- 17) Nakai W, *et al.* (2016) A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. *Sci Rep*, **6** : 33935.
- 18) Witwer KW, *et al.* (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*, **2**.
- 19) Lotvall J, *et al.* (2014) Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions : a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*, **3** : 26913.
- 20) Consortium E-T, *et al.* (2017) EV-TRACK : transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat Methods*, **14** (3) : 228-232.

PS亲和法

前言

外泌体是各种细胞分泌的直径在30-100 nm之间的细胞膜囊泡。因含mRNA、microRNA等核酸和蛋白质,使其具有与相邻细胞交换信息的功能。外泌体作为细胞间信号传导的通讯工具和癌症等各种疾病的生物标记物而备受关注^{1,2)}。因此,这几年各领域广泛展开外泌体相关的研究,然而,目前用于外泌体研究的实验技术仍处于开发阶段,许多问题仍有待改进。

例如,外泌体纯化方法中,超速离心法和聚合物沉淀法(市售试剂盒)提取的外泌体中混有多种杂质,会给后续实验造成许多障碍。而抗体亲和法和密度梯度离心法这两种提取方法的问题在于,虽然可以提取到高纯度的外泌体,但外泌体结构不完整,无法用于分析外泌体的生理功能。

而被广泛用于外泌体检测的一般方法——Western blotting (WB) 和ELISA检测,又存在检测时需使用大量外泌体、难以检测到低表达水平的标记蛋白等问题。

Wako开发了一种新的外泌体分析工具来解决上述外泌体研究的实验技术中的各种问题。这种新技术阐明如下:本材料的P8开始是关于MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS (MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS) 提取高纯度细胞外囊泡的介绍,P18~P21以及P23~P25是关于PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (PS Capture™ Exosome ELISA Kit) 高灵敏度检测细胞外囊泡的介绍。

磷脂酰丝氨酸和Tim4新型外泌体提取法

外泌体膜虽然含有分泌细胞源蛋白质和脂质,但目前普遍认为在活细胞中磷脂酰丝氨酸(PS)通过脂质翻转酶作用定位于细胞膜内侧,同时也暴露在外泌体膜外侧³⁾。作为通过巨噬细胞进行细胞凋亡的吞噬受体(T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-containing protein 4, Tim4)蛋白通过细胞外域IgV域与结合了钙离子的PS结合⁴⁾。

以上述知识作为参考,我们利用Tim4固化磁珠,在钙离子存在下捕捉培养上清和血清等样品中的外泌体,再添加螯合剂可提取外泌体,这种划时代外泌体提取方法是由Wako和金泽大学医学系免疫学华山教授共同开发并取得了成功⁵⁾。并且**MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS实现了比传统的外泌体纯化法更加简单地提取高纯度完整状态的外泌体**。这是迄今为止取代黄金标准超速离心法的新型外泌体纯化法。

1) Tkach, M. *et al.* Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* **164**, 1226-1232 (2016).

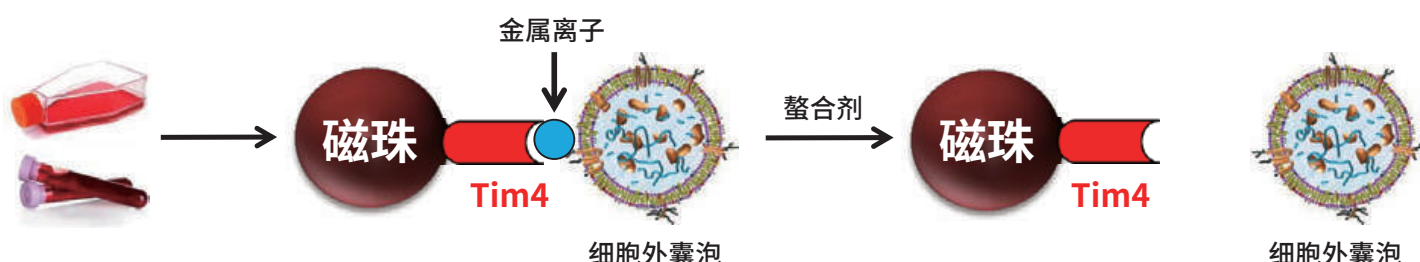
2) Raimondo, F. *et al.* Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics* **11**, 709-720 (2011).

3) Trajkovic, K. *et al.* Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* **319** (5867): 1244-7 (2008).

4) Miyanishi, M. *et al.* Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* **450**, 435-439 (2007).

5) Nakai, W. *et al.* A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. *Sci. Rep.* **6**, 33935 (2016).

对细胞外囊泡膜表面的磷脂酰丝氨酸(PS)进行亲和的新方法

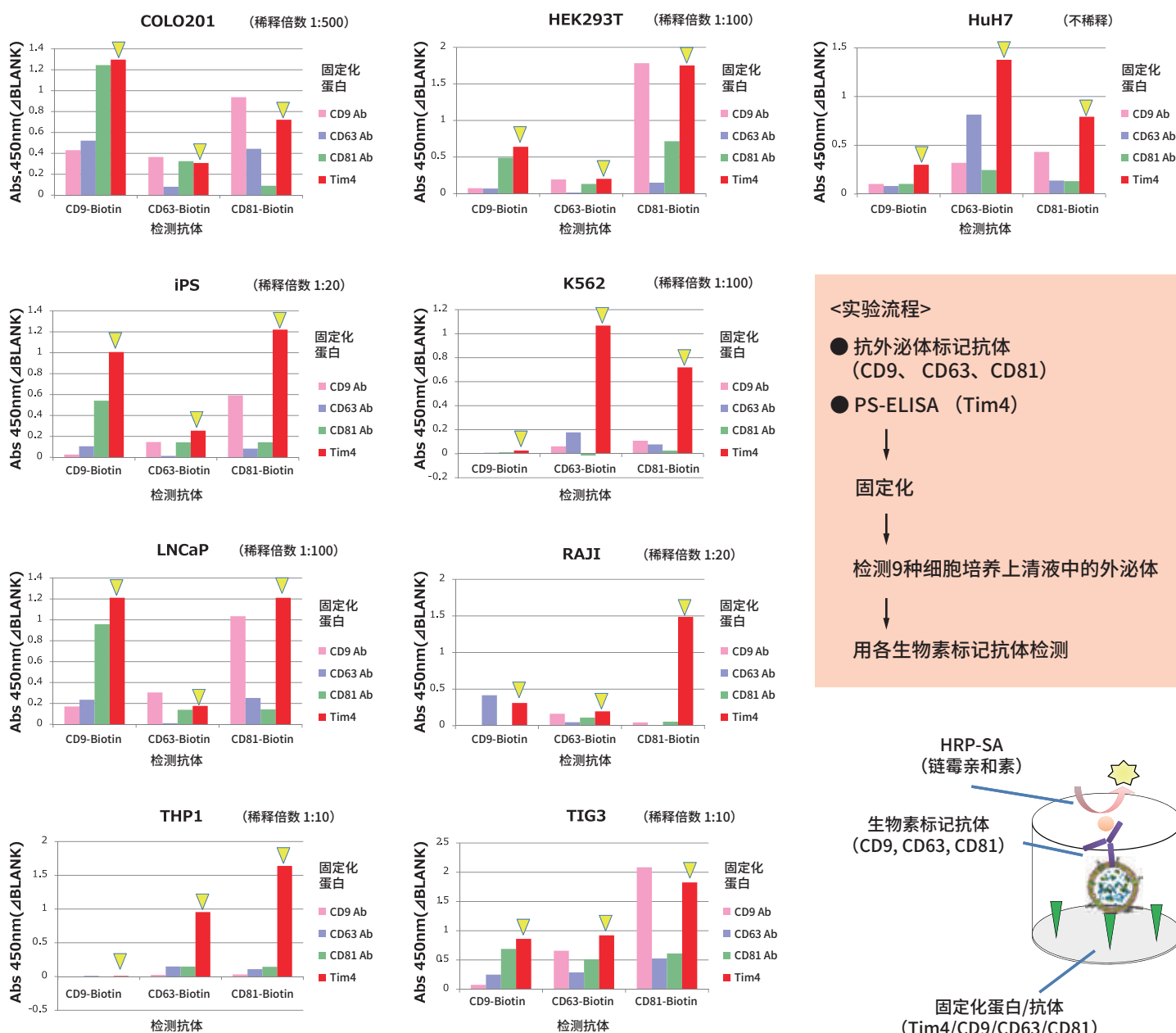


通过Tim4蛋白以金属离子依赖方式结合细胞外囊泡膜表面的磷脂酰丝氨酸(PS),从而对其进行捕获,捕获的细胞外囊泡以螯合剂洗脱。

PS亲和法

比较Tim4和抗外泌体标记抗体的捕获性能

使用9种细胞培养上清 (经过10,000×g离心处理), 用 Tim4以及其他外泌体标记抗体捕获样品中的外泌体后, 使用生物素标记的抗外泌体标记抗体 (CD9, CD63, CD81) 进行检测。

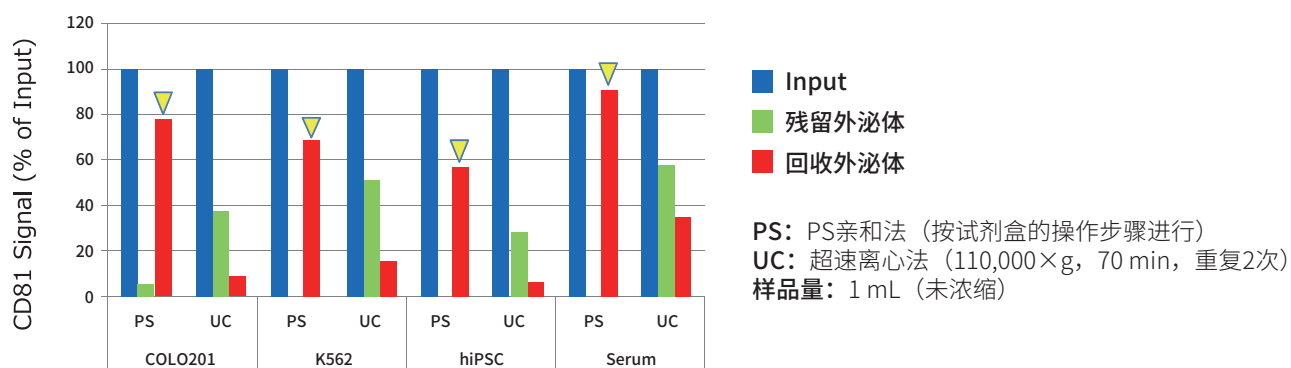


相比抗外泌体标记抗体, Tim4可以更加有效地捕获不同种细胞来源的外泌体。

PS亲和法

与超速离心法比较回收率

以 $10,000 \times g$ 离心处理的各细胞培养上清以及人血清样品中,用PS亲和法(PS)以及超速离心法(UC)分离和纯化外泌体后,用PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒检测外泌体标记CD81的信号。从得到的各样品的吸光度,比较分离后的样品中残留的外泌体以及外泌体的回收率。



➡ 可以发现PS亲和法比起超速离心法,能更有效地提取各种细胞系以及血清来源的外泌体。

MagCapture™ 外泌体提取试剂盒 PS

产品概要及特点

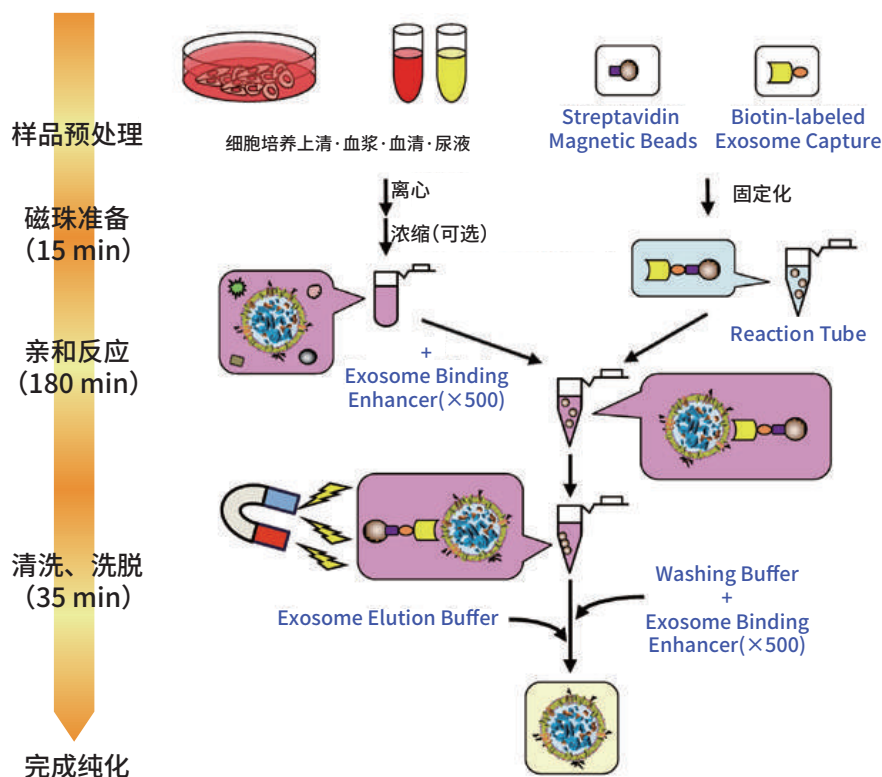
【产品概要】

MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS提供了一种新型亲和策略(即PS亲和法),通过采用磷脂酰丝氨酸(PS)结合蛋白和磁珠,即可简便高效地分离出膜表面具有PS的高纯度外泌体和其他细胞外囊泡。如需要更高纯度的外泌体,可以10,000×g离心后的上清作为样品。本试剂盒采取金属离子依赖方式捕获细胞外囊泡,通过使用螯合剂,可在中性的条件下洗脱出完整的细胞外囊泡,提取的细胞外囊泡可以应用于电子显微镜分析、纳米颗粒跟踪分析、给药实验、结构分子(蛋白、脂质、核酸等)分析等。

【特点】

- 高纯度及完整细胞外囊泡
- 可从血清、血浆、尿液等液样品中提取外泌体
- 重复性高,回收量稳定
- 操作简单,可同时处理多个样品(无需超速离心)

MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS操作步骤



【产品图片】



【试剂盒内容】

本试剂盒包含7个组分。

试剂盒组分 (2次用)	包装
(1) Streptavidin Magnetic Beads	120 μ L $\times$ 1 tube
(2) Biotin-labeled Exosome Capture	20 μ L $\times$ 1 tube
(3) Exosome Capture Immobilizing Buffer	7 mL $\times$ 1 bottle
(4) Exosome Binding Enhancer($\times$ 500)	100 μ L $\times$ 1 tube
(5) Washing Buffer	30 mL $\times$ 1 bottle
(6) Exosome Elution Buffer	1 mL $\times$ 1 bottle
(7) Reaction Tube	4 tubes

试剂盒组分 (10次用)	包装
(1) Streptavidin Magnetic Beads	600 μ L $\times$ 1 tube
(2) Biotin-labeled Exosome Capture	100 μ L $\times$ 1 tube
(3) Exosome Capture Immobilizing Buffer	35 mL $\times$ 1 bottle
(4) Exosome Binding Enhancer($\times$ 500)	500 μ L $\times$ 1 tube
(5) Washing Buffer	75 mL $\times$ 2 bottles
(6) Exosome Elution Buffer	5 mL $\times$ 1 bottle
(7) Reaction Tube	22 tubes

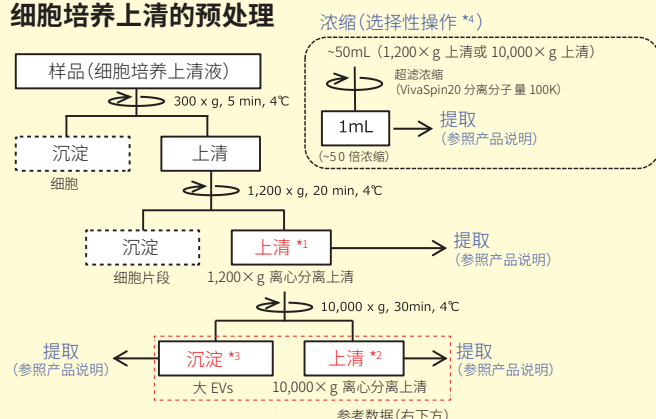
*外泌体捕获固定化磁珠使用一次后最多可再回收利用4次。试剂盒配套有足量的缓冲液。如果对同一样品进行反复浓缩,或对不同样品处理时可避免污染的情况下,可考虑再循环使用。如果磁珠发生了聚集且无法用枪头打散,请勿继续使用。

各种样品的预处理操作

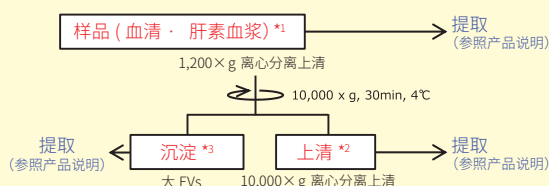
本步骤是样品预处理操作。如果要提取外泌体和其他细胞外囊泡(如微囊泡), 请按照下述操作制备1,200×g离心的上清组分^{*1}。如果要回收更高纯度的外泌体, 则按照下述操作制备10,000×g离心的上清组分^{*2}。

以下为细胞培养上清、血清和血浆样品时的预处理方法。使用其他体液样品时, 请参考血清和血浆样品的实验步骤, 作适当调整。

细胞培养上清的预处理



血清·肝素血浆的预处理



*1 提取外泌体+大EVs时, 请使用1,200×g 上清作为提取样品。

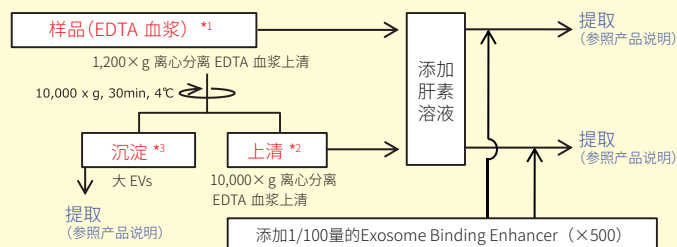
*2 回收外泌体时, 请使用10,000×g 上清作为提取样品。

*3 提取大 EVs 时, 将10,000×g 离心所得的沉淀, 用TBS 悬浮后, 作为样品使用。

*4 浓缩是以大体积 (~50 mL) 的细胞培养上清液作为提取样品, 是选择性的操作步骤。但它可以提高回收率, 所以还是尽可能进行该步骤。

*5 由于EV-Save™ 含有聚合物, 不建议用于蛋白质组学分析样品。

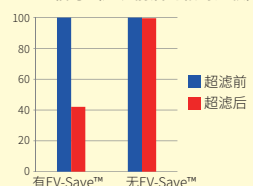
EDTA 血浆的预处理



超滤浓缩培养上清时的注意事项

证明在对细胞外囊泡进行超滤浓缩时, 细胞外囊泡会吸附在柱上, 降低回收率。添加EV-Save™ 细胞外囊泡封闭试剂, 抑制浓缩过程中细胞外囊泡回收量的损失⁵。

CD63信号(超滤前后的相对比较)



关于10,000×g离心处理上清的过滤处理

从样品去除凋亡小体和微囊泡等的Large EVs时, 回收10,000×g, 30 min离心的上清液, 请使用经针头式过滤器 (Millipore Ultrafree-MC, GV 0.22 μm sterile, 产品编号: UFC30GV0S) 过滤后的滤液作为样品。

大量样品和少量样品操作时的注意点

大量样品时

若从大量细胞培养上清 (~50 mL) 中提取外泌体, 建议对样品进行浓缩操作。为了提高回收率, 请尽量按此进行操作。

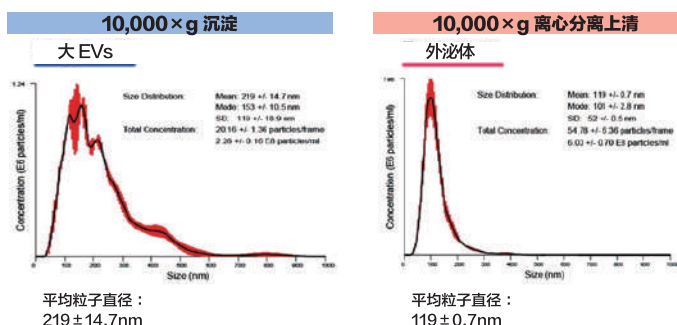
少量样品时

样品体积不足0.5 mL时, 无法用旋转混合仪对外泌体捕获固定化磁珠和样品进行充分混匀, 必要时, 可以添加TBS缓冲液将样品体积增加至0.5 mL以上 (如100~200 μL → 500 μL)。

参考数据: 外泌体和大EVs的NTA分析

以莫能菌素钠促进外泌体分泌, 收集K562培养上清1 mL, 然后在10,000×g离心后分离出上清和沉淀 (用1 mL TBS悬浮)。

用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒 (MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS) 提取细胞外囊泡, 用NanoSight LM10进行分析。



应用数据

从培养上清样品中提取细胞外囊泡的分析

<各种样品的制备方法>

MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS【PS亲和法】

按照试剂盒操作说明（反应时间：3 h），从1 mL经过离心处理（10,000×g，30 min）的K562细胞培养上清（无血清培养基或含10%去外泌体FBS的培养基*1）中回收外泌体。

超速离心法

将10 mL经过离心处理（10,000×g，30 min）的K562细胞培养上清（无血清培养基或含10%去外泌体FBS的培养基*1）进行超离（110,000×g，70 min），用TBS缓冲液重悬沉淀物后，再进行超离（110,000×g，70 min），回收沉淀部分。

聚合物沉淀法

从1 mL经过离心处理（10,000×g，30 min）的K562细胞培养上清（无血清培养基或含10%去外泌体FBS的培养基*1）中，按照市售的Company A产品的操作说明（静置过夜）回收外泌体。

*1: 110,000×g离心2 h，在不沾到沉淀的前提下回收上清。

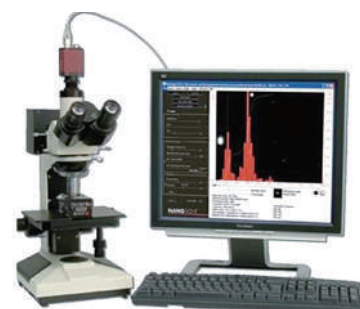
利用NanoSight分析外泌体

用NanoSight M10*装置分别对MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS、超速离心法、聚合物沉淀法提取的外泌体进行分析。

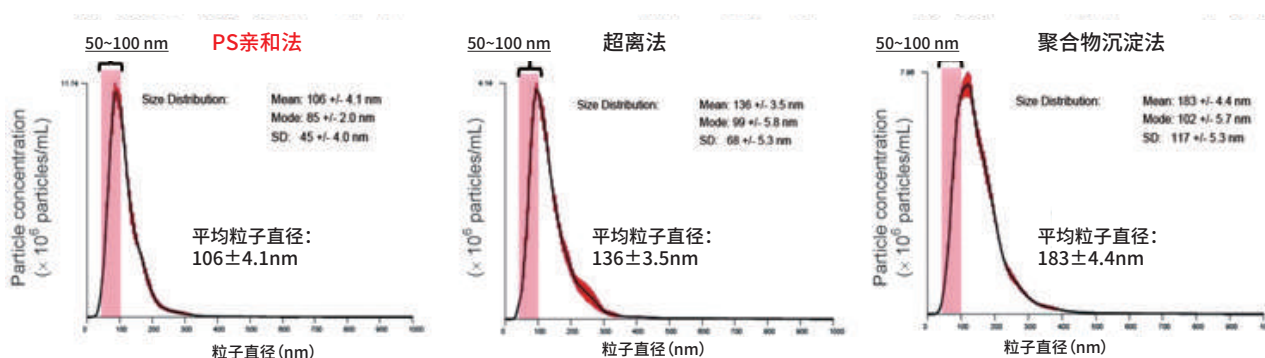
*NanoSight是通过NTA（Nano Tracking Analysis）将溶液中纳米颗粒所做的布朗运动可视化，从而分析纳米颗粒直径和浓度的分析装置。即使溶液中的粒子是各种物质的混合物或是粒径参差不齐的多分散系，也可通过可视化技术获得纳米颗粒的布朗运动的观察视频，然后检测不同粒径的粒子数量。

【实验内容和结果】

将利用各种方法获取的外泌体分别用超纯水稀释至适当浓度，用 NanoSight 对粒子直径和粒子浓度进行分析（图 1）。结果表明，PS 亲和法所提取的外泌体在指定粒径范围内（50~100 nm）的粒子浓度更高，纯度更高。



NanoSight M10



(Sci Rep. 2016 Sep 23;6:33935. Nakai W et al.)

图 1. 利用不同方法回收的外泌体进行 NanoSight LM10 的分析结果

利用透射电子显微镜分析外泌体

电子显微镜可以通过利用电子束获取检测对象的放大图像。电子束被视作电磁波时，由于其波长非常短，可观察到比光学显微镜更清晰的高倍率图像，因此被应用于金属/高分子材料、大/小鼠等活体组织、植物、食品等含水物质的所有样品的观察、分析。

【实验内容和结果】

本次利用透射电子显微镜（TEM）对外泌体进行分析（图2）。

【使用样品】

① PS亲和法回收样品

样品：COLO201 细胞培养上清 10 mL

提取法：MagCapture™ 外泌体提取试剂盒（产品编号：293-77601）

粒子数： 3.69×10^{10} 颗粒/mL

② 超离法回收样品

样品：COLO201细胞培养上清 10 mL

提取法：超离法

粒子数： 1.68×10^{10} 颗粒/mL

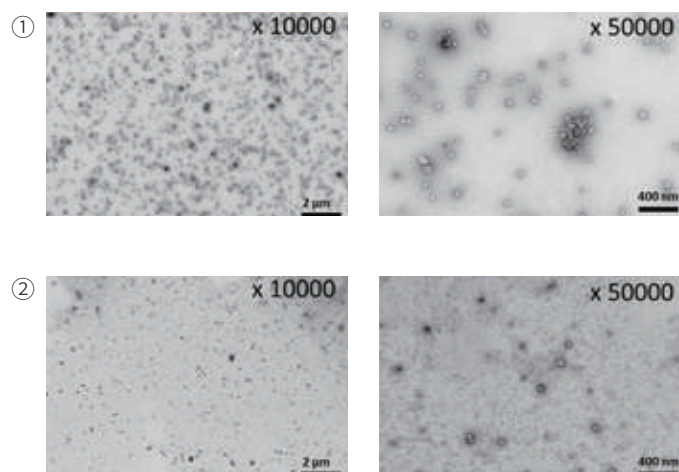
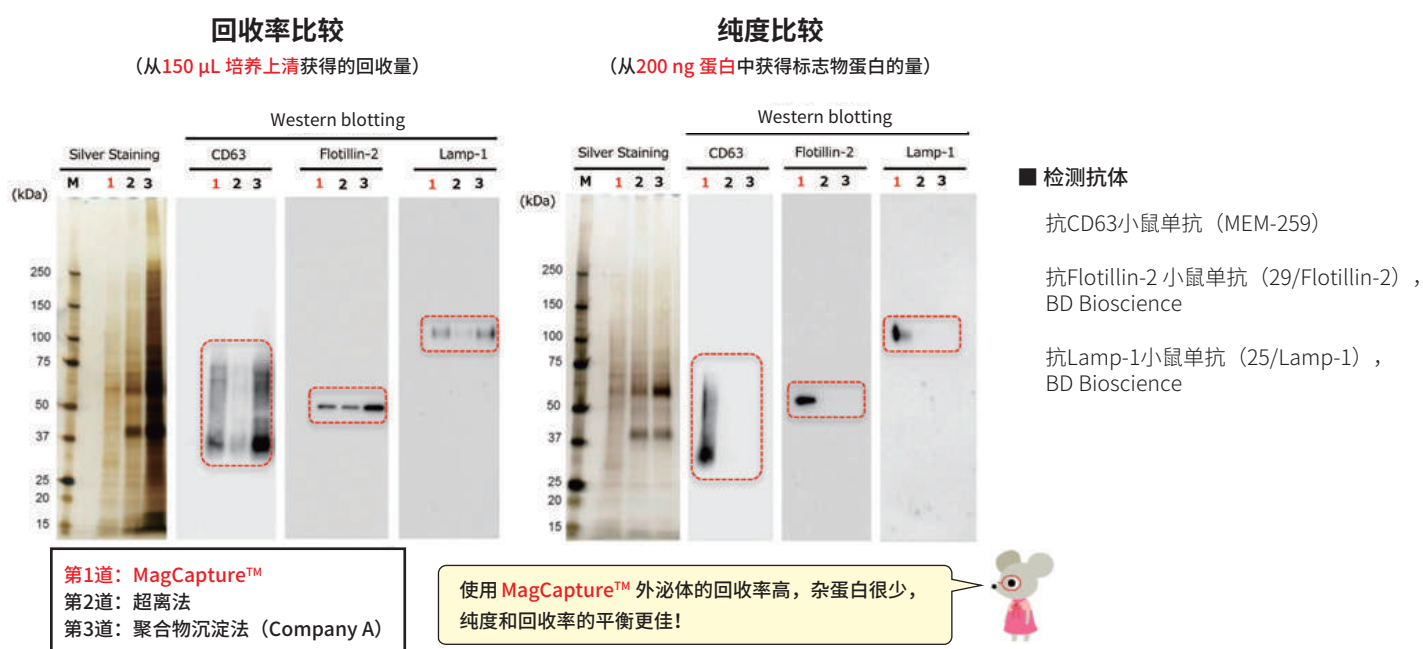


图 2. 电子显微镜分析结果

从K562细胞培养上清提取的外泌体回收率和纯度的比较(无血清培养基)

用MagCapture™、超离和聚合物沉淀法从K562 细胞培养上清（无血清培养基）中提取的样品并进行电泳。接着用银染和Western blotting（抗CD63抗体，抗Flotillin-2抗体和抗Lamp-1抗体）进行检测。



从K562细胞培养上清提取外泌体的回收率和纯度的比较 (含10%去外泌体FBS的培养基)

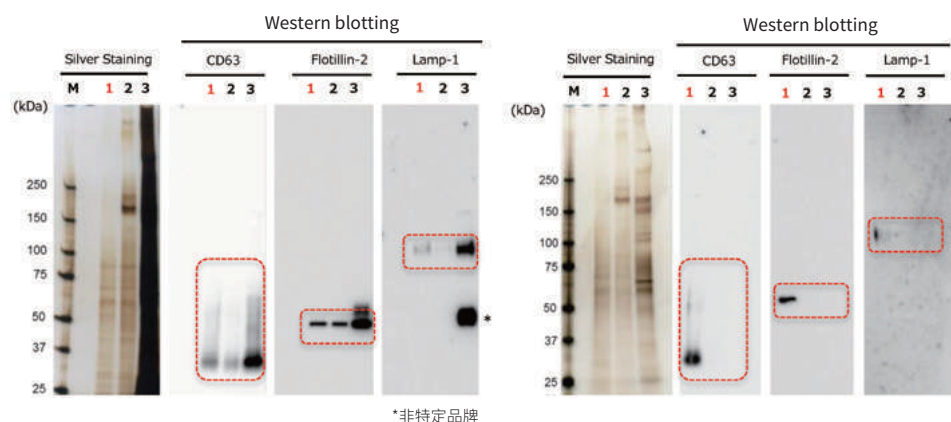
用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒、超离法和聚合物沉淀法从K562 细胞培养上清中 (含10%去外泌体FBS的培养基) 回收样品并进行电泳, 然后用银染和Western blotting (抗CD63抗体, 抗Flotillin-2抗体和抗Lamp-1抗体) 进行检测。另外用MS分析提取物中的组分, 比较所有待测多肽中K562细胞来源的人源多肽的比例。细胞培养基所含的FBS来源的牛蛋白聚集体杂质越多, 人来源多肽的比例就越低。

回收量比较

(从150 μ L 培养上清获得的回收量)

纯度比较

(从200 ng 蛋白中获得标志物蛋白的量)



检测抗体

抗CD63小鼠单抗 (MEM-259)

抗Flotillin-2 小鼠单抗 (29/Flotillin-2), BD Bioscience

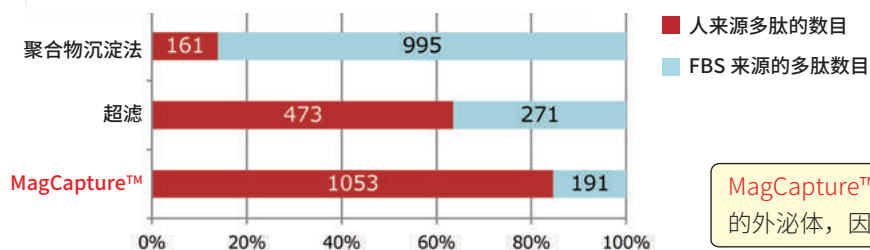
抗Lamp-1小鼠单抗 (25/Lamp-1), BD Bioscience

第1道: MagCapture™

第2道: 超离法

第3道: 聚合物沉淀法 (Company A)

比较质谱分析人源多肽的百分比



MagCapture™ 可从FBS添加培养基提取高纯度的外泌体, 因此在低背景下可进行质谱分析



应用数据

分析从血清、血浆、尿液样品中提取的细胞外囊泡

比较从人血清中分离的外泌体的回收率

使用本试剂盒、超离法和表面抗原的抗体亲和法提取1 mL人血清样品中的外泌体，然后通过Western blotting（抗CD9抗体、抗CD63抗体）进行检测。



与超离法、抗体亲和法相比，**MagCapture™** 的外泌体回收率更高。



■ 检测抗体

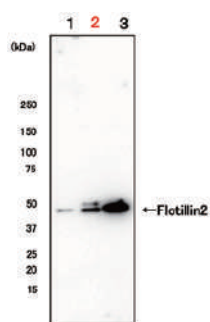
抗CD9兔多抗, System Bioscience
抗CD63兔多抗, System Bioscience

■ Western blotting (WB) 数据

各样品的信号相当于150 μ L的血清样品。从100 μ L洗脱液中取出15 μ L，添加5 μ L的4 $\times$ SDS sample buffer，全部上样。

从人EDTA血浆样品中分离外泌体

分别从1 mL的EDTA血浆、EDTA血浆（超滤置换缓冲液）、人血清样品中提取外泌体，并通过Western blotting（抗Flotillin2抗体）进行检测。



第1道: EDTA血浆
第2道: EDTA血浆（超滤置换缓冲液）
第3道: 血清

通过超滤置换缓冲液后，可以更高效地提取外泌体。



■ 检测抗体

抗Flotillin-2小鼠单抗 (29/Flotillin-2),
BD Bioscience

■ 样品量

各1 mL

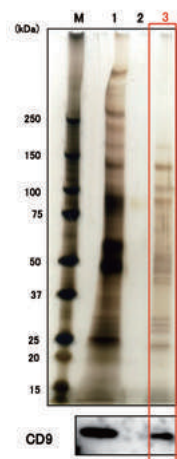
■ Western blotting (WB) 数据

各样品的信号分别对应150 μ L样品量。从100 μ L提取物中取出15 μ L，添加5 μ L的4 $\times$ SDS sample buffer，全部上样。

比较从人尿液样品中分离的外泌体的回收率

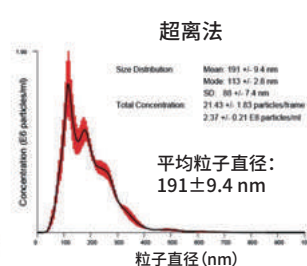
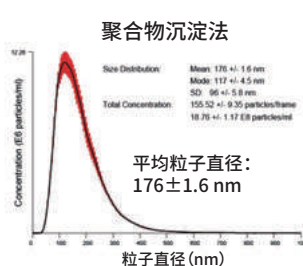
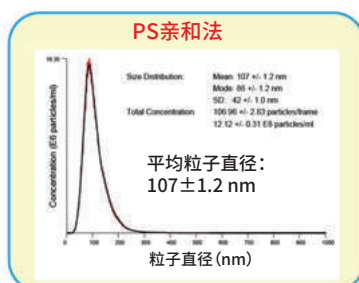
用本试剂盒、聚合物沉淀法、超离法从1 mL人尿液样品中提取外泌体，并通过Western blotting（抗CD9抗体）进行检测。

标记蛋白回收量比较



第1道: 聚合物沉淀法
第2道: 超离法
第3道: PS亲和法

粒子径比较 (NTA)



从尿液中也可以提取高纯度外泌体哦~~



■ 检测抗体

抗CD9兔多抗,
System Biosciences

■ 样品量

各1 mL

■ Western blotting (WB) 数据

各样品结果分别对应150 μ L尿液样品。从100 μ L提取物中取出15 μ L，加入5 μ L的4 $\times$ SDS sample buffer，全部上样。

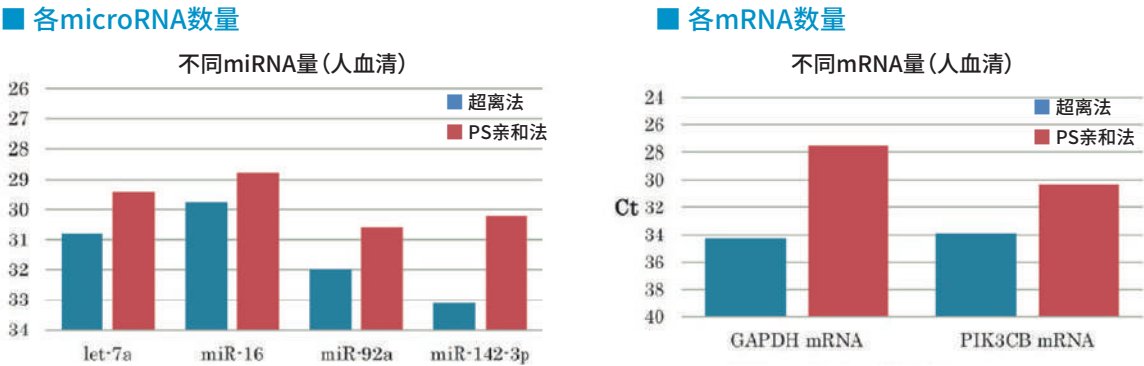
应用数据

比较健康人血清来源外泌体中microRNA和mRNA的回收率

实验数据

①比较不同方法制备的外泌体中的microRNA和mRNA的回收率

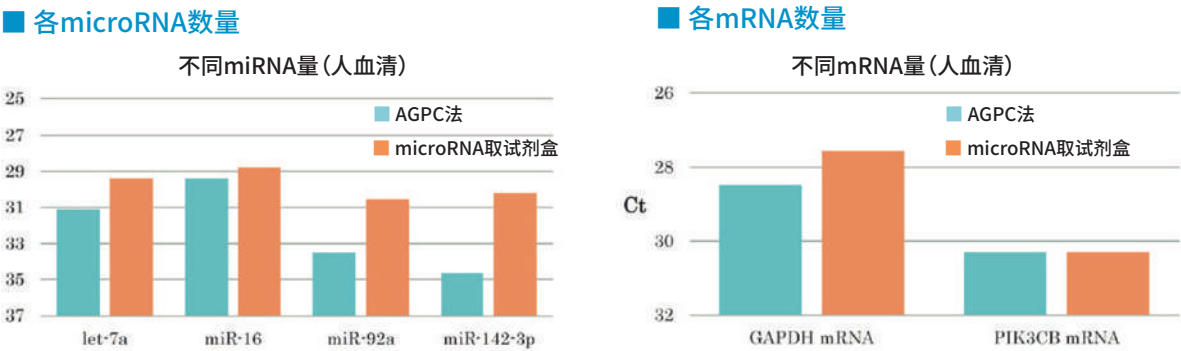
通过超离法和PS亲和法从正常人血清样品中分离外泌体，然后使用microRNA Extractor® SP Kit（产品编号：295-71701）抽提RNA。通过qPCR检测microRNA量（let-7a, miR-16, miR-92a, miR-142-3p）和mRNA（GAPDH, PIK3CB），对Ct值进行比较。



PS亲和法比超离法回收的外泌体能更有效地提取microRNA和mRNA。

②比较来自PS亲和组分中的RNA提取法

运用PS亲和法从正常人血清样品中分离出外泌体后，使用microRNA Extractor® SP Kit（产品编号：295-71701）以及酸-异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法（AGPC法）抽提RNA。通过qPCR检测microRNA（let-7a, miR-16, miR-92a, miR-142-3p）和mRNA（GAPDH, PIK3CB）的量，对Ct值进行比较。



对比AGPC法，使用microRNA Extractor® SP Kit 能更有效抽提外泌体中的microRNA和mRNA。

【相关产品】

■microRNA Extractor® SP Kit

本产品可从人或动物的血清、血浆中提取包含microRNA在内的总RNA。无需使用传统提取法所必须的苯酚、氯仿等剧毒试剂，即可高效地提取microRNA。

产品编号	产品名称	包装
295-71701	microRNA Extractor® SP Kit microRNA提取试剂盒	50 tests

应用数据

外泌体蛋白质组学分析

<实验内容及结果>

分别以PS亲和法、超离法和聚合物沉淀法，从K562细胞培养上清（含10%去外泌体FBS的培养基）中提取外泌体。将提取样品以10% SDS-PAGE进行分离，切下全部蛋白条带。然后进行胶内消化，用液相色谱质谱（LC-MS）对蛋白进行鉴定。比较上述三种方法提取的外泌体（n=3）中检测蛋白的成对相关性。

通过MASS分析鉴定的前10种蛋白质的比较

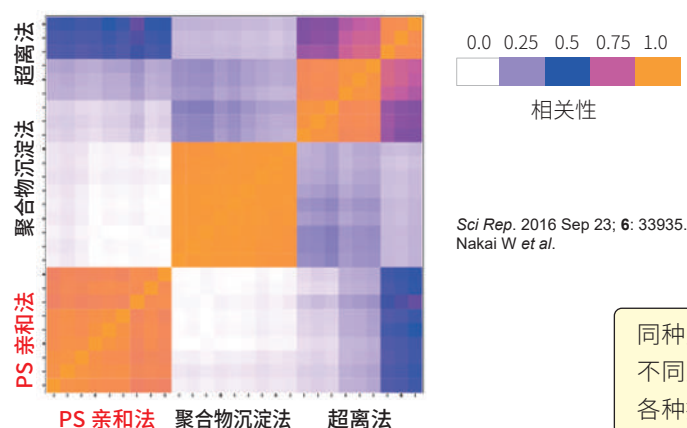
白色柱：外泌体来源人蛋白 灰色柱：牛血清来源牛蛋白 红色：外泌体标记蛋白

样品：K562细胞培养上清（含10%去外泌体FBS的培养基）

	PS亲和法	超离法	聚合物沉淀法
1	71 kDa热休克同源蛋白 (Heat shock cognate 71kDa protein)	DNA依赖蛋白激酶催化亚基 (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)	补体C3 (Complement C3)
2	膜联蛋白A6 (Annexin A6)	铁转蛋白受体1 (Transferrin receptor protein1)	α 2-巨球蛋白 (Alpha-2-macroglobulin)
3	转铁蛋白受体1 (Transferrin receptor protein1)	血清白蛋白 (Serum albumin)	纤连蛋白 (Fibronectin)
4	V-ATP酶A亚基 (V-type proton ATPase catalytic subunit A)	ATP依赖RNA解旋酶 (ATP-dependent RNA helicase A)	血清白蛋白 (Serum albumin)
5	浮肌蛋白-2 (Flotillin-2)	微管蛋白 β 5 (Tubulin beta-5 chain)	血小板反应蛋白-1 (Thrombospondin-1)
6	程序性细胞死亡6互作蛋白 (Programmed cell death 6-interacting protein)	71 kDa热休克同源蛋白 (Heat shock cognate 71 kDa protein)	补体C4 (Complement C4)
7	细胞表面抗原4F2重链 (4F2 cell-surface antigen heavy chain)	脂肪酸合成酶 (Fatty acid synthase)	α -1抗蛋白酶 (Alpha-1-antiproteinase)
8	膜联蛋白A1 (Annexin A1)	细胞表面抗原4F2重链 (4F2 cell-surface antigen heavy chain)	载脂蛋白- β -100 (Apolipoprotein- β -100)
9	220 kDa激酶D相互作用底物 (Kinase D-interacting substrate of 220 kDa)	U5小核核糖核蛋白解旋酶 (U5 small nuclear ribonucleoprotein helicase)	胎儿血红蛋白亚单位 (Hemoglobin fetal subunit beta)
10	膜联蛋白A2 (Annexin A2)	β 4微管蛋白 (Tubulin beta-4B chain)	β 5微管蛋白 (Tubulin beta-5 chain)

聚合物沉淀法中混入了牛血清来源蛋白，与之相比，PS亲和法检测出了更多的标记蛋白。

成对相关性比较



样品：K562细胞培养基（含10%去外泌体FBS的培养基）

方法	相关性
超离法	★
聚合物沉淀法	★★
PS亲和法	★★

同种方法的相关性：PS亲和法和聚合物法较高，超离法稍低。
不同方法的相关性：较低。
各种提取方法获得的外泌体亚群可能不同。

应用数据

Protein Assay BCA Kit检测外泌体的蛋白质浓度

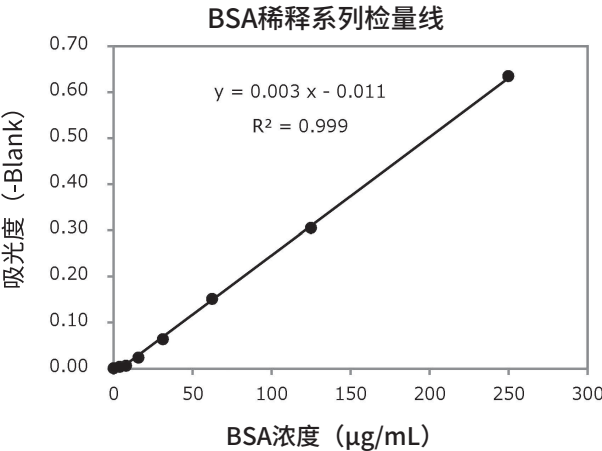
Protein Assay BCA Kit是利用二辛可宁酸(BCA)定量检测溶液中的蛋白浓度的试剂盒,是蛋白定量检测法中通用的方法。其原理为,碱性条件下通过蛋白将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ 。 Cu^+ 与BCA形成络合物时产生紫色螯合物,螯合物的紫色会随着蛋白浓度变深,通过检测该紫色在562 nm处的吸光度,并与标准曲线作比较,即可定量溶液中的蛋白浓度。

以下实验是通过Protein Assay BCA Kit高灵敏地检测用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS从细胞培养上清中提取的外泌体中的蛋白浓度。



<实验内容及结果>

将用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS提取的25 μL 外泌体溶液分装到96孔板中,加入 Protein Assay BCA Kit中配套的试剂A和试剂B混合液200 μL 。60°C孵育30 min,检测560 nm的吸光度(图1)。结果表明,通过Protein Assay BCA Kit的高灵敏度检测,可检测纯化后外泌体中的蛋白浓度。



定量从10 mL COLO201细胞培养上清液(5倍浓缩)中纯化的外泌体的蛋白浓度。



吸光度(-BLANK) = 0.1152
蛋白浓度 = 49.2 $\mu\text{g/mL}$

图1. Protein Assay BCA Kit检测BSA的检量线形图和纯化外泌体的蛋白浓度检测

产品编号	产品名称	包装
297-73101	Protein Assay BCA Kit 蛋白测定试剂盒(二喹啉甲酸)	250次用

<BCA Assay 操作概要>

由于外泌体的蛋白浓度非常低,因此BCA检测时不需要对样品进行稀释。

- ① 将BSA标准品溶液按照250、125、62.5、31.25、15.625 $\mu\text{g/mL}$ 和空白对照,分别以25 μL /孔分装到96孔板中;
- ② 把外泌体纯化品和洗脱缓冲液(空白)按照25 μL /孔加入96孔板;
- ③ 把200 μL Protein Assay BCA Kit(产品编号: 297-73101)的试剂A和试剂B混合液(A:B=50:1)添加至①,②中;
- ④ 60°C孵育30 min;
- ⑤ 将96孔板冷却到室温;
- ⑥ 检测560 nm下的吸光度。

应用数据

外泌体的标记和Hela细胞摄取实验

【实验概要】

用PKH67 (Sigma) 标记MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS提取的细胞外囊泡，证实其是否有进入到Hela细胞中的能力。

< 以PKH67标记的外泌体>

1. MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS提取的外泌体（实验当天从COLO201细胞培养上清中提取）；

*在进行步骤6-7的凝胶过滤处理时，如果想要抑制标记样品的吸附损失，请添加EV-Save™ 细胞外囊泡封闭试剂至试剂盒配套的洗脱液中制备样品

2. 用BCA和NanoSight检测样品的蛋白浓度和粒子浓度；

3. 将外泌体样品溶液分装至1.5 mL试管中；

*这次虽然使用了相当于3 μg蛋白量的外泌体，但是标记所需的外泌体量，请按需制备

4. 将2.0 μL的PKH linker溶解在0.25 mL的Diluent C (PKH67试剂盒配套) 中，得到4×Dye Solution*；

*按实验所需的合适的量配制

5. 添加样品体积1/3的4×Dye Solution至样品中，混匀后在室温下孵育5-10 min；

6. 根据附带的操作说明用PBS平衡Exosome Spin Columns (MW 3000) (Thermo)；

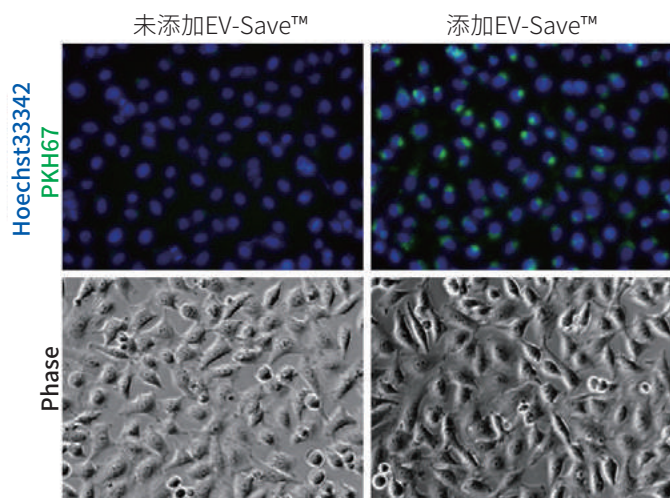
7. 将100 μL各样品分别加入上述平衡后的离心柱*中，750×g，2 min离心以去除未标记的染料；

*由于每根离心柱的最大上样量为100 μL，若样品量超过100 μL，请留一部分样品不要全部上样；

8. 将标记好的外泌体溶液*加入到已经提前一天已铺好Hela细胞的培养皿中，24 h后用显微镜观察并利用流式细胞仪进行分析。

*根据实验调节外泌体添加量

显微镜观察结果



流式细胞仪分析结果

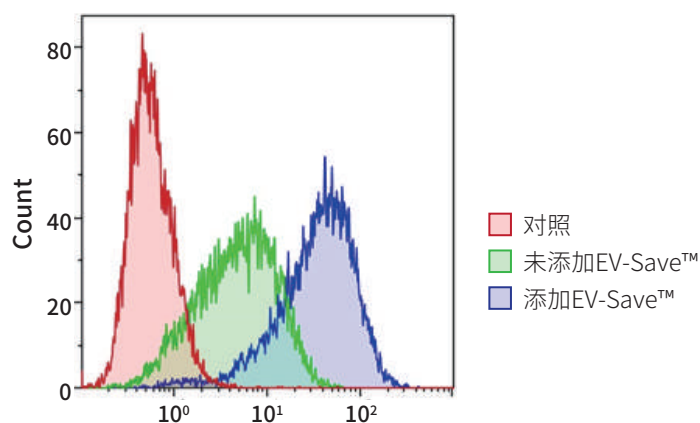


图1. 确认PKH67标记外泌体的摄取情况

关于使用**MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS**分离的COLO201来源外泌体样品（总蛋白量3 μg，粒子数 1×10^{10} 个），用PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma) 进行标记后，用荧光显微镜（左）和流式细胞仪（右）检测HeLa细胞的摄取情况。

无论是显微镜还是流式细胞仪都可以检测到PKH67标记的外泌体通过胞吞作用被捕获。另外添加了EV-Save™ 细胞外囊泡封闭试剂的样品在去除Dye时，也抑制了凝胶过滤柱对外泌体的吸附。

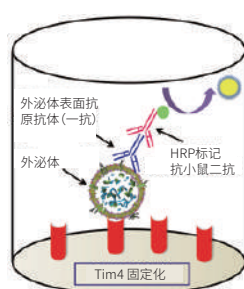


PS亲和法在ELISA中的应用

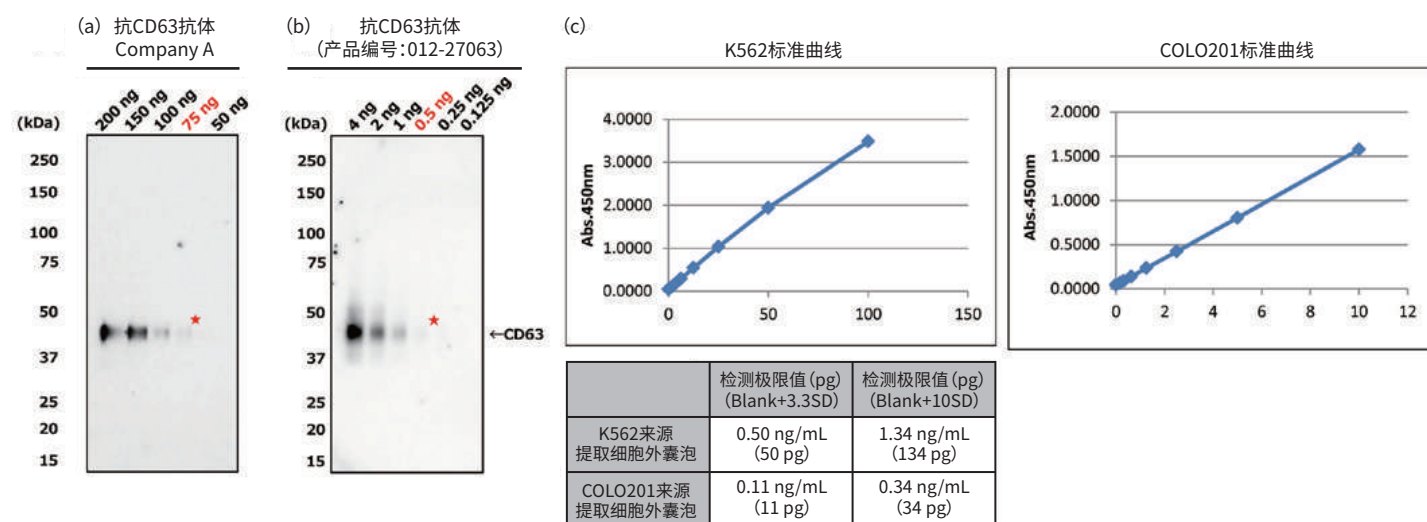
前言

基于Tim4蛋白通过PS和外泌体亲和性结合的特性, FUJIFILM Wako也开发了PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (PS Capture™ Exosome ELISA Kit)。本试剂盒将外泌体表面标记蛋白的抗体固定化, 相比以前的ELISA法, 可高灵敏度地检测外泌体。此方法是将培养上清和血清等含有外泌体的样品添加到Tim4蛋白固定化的干板中, 在钙离子条件下捕获外泌体, 通过对外泌体表面标记蛋白进行一抗结合反应和二抗结合反应, 从而实现对外泌体检测 (图2)。此外, 本试剂盒配套了鼠源抗人CD63单抗作为一抗, 但如果检测其他外泌体表面标记的话, 需另行购买其他鼠源一抗。

检测原理



本试剂盒最大特点就是比起Western blotting和传统的Exosome ELISA产品可以更高灵敏度地检测外泌体。首先, 为了用本试剂盒和Western blotting比较检测灵敏度, 对Western blotting中外泌体的临界值进行了检测 (图1a, b)。结果显示, 使用人结肠癌细胞的COLO201细胞来源纯化外泌体作为样品通过抗CD63单抗进行Western blotting实验, 最高可以检测出蛋白含量75 ng的外泌体。然后, 用本试剂盒检测人白血病来源细胞系K562以及COLO201细胞来源纯化外泌体的ELISA检测极限值, K562细胞来源纯化外泌体的检测临界值为49.9 pg, COLO201细胞来源纯化外泌体的检测临界值为10.9 pg。由此可明确地看出本试剂盒具有Western blotting 1000倍以上的检测灵敏度 (图1c)。另外, 已有Exosome ELISA产品的灵敏度在ng~μg之间 (参考各产品手册), 但是本试剂盒通过PS与Tim4蛋白亲和性结合比传统的固定化外泌体表面标记抗体ELISA法在灵敏度上高出100倍以上。



比免疫印迹检测更高灵敏度地检测出标记蛋白。

图1. Western blotting和ELISA的检测灵敏度比较

(a), (b) 使用各种抗CD63抗体 (其他公司产品, Wako产品编号: 012-27063) 进行Western blotting实验检测灵敏度数据
样品: COLO201细胞培养上清中纯化的外泌体 (使用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS提取)

★: 各抗体Western blotting实验的检测极限值。

(c) Exosome ELISA Kit检测极限数据

用本试剂盒检测进行了梯度稀释的K562细胞来源和COLO201细胞来源纯化外泌体 (使用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS提取) 样品和缓冲液的空白值, 制作K562和COLO201的标准曲线。利用此标准曲线可算出K562和COLO201的最低检测灵敏度。(检测不同浓度n=6, 空白n=12)

PS Capture™ 外泌体 ELISA 试剂盒 (抗小鼠 IgG POD)

产品概要及特点

【产品概要】

本试剂盒是可以定性分析细胞培养上清和体液样品中提取的细胞外囊泡, 以及定量分析细胞培养上清样品中的细胞外囊泡的ELISA试剂盒。让细胞外囊泡表面的磷脂酰丝氨酸 (PS) 特异性结合的蛋白在固定化的板上与细胞外囊泡反应并固定后, 用任意细胞外囊泡表面标记蛋白的小鼠单抗作为检测一抗, 试剂盒中的HRP标记抗小鼠IgG抗体为二抗, 可高灵敏度检测表面具有任意标记蛋白的细胞外囊泡。另外, 试剂盒含有作为对照检测用一抗的抗人CD63小鼠单抗, 可检测出人CD63阳性细胞外囊泡。

通过使用本试剂可以检测用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS (产品编号: 293-77601) 提取的细胞培养上清和体液样中的细胞外囊泡的表面标记蛋白, 比起Western blotting有着50~1,000倍高的灵敏度且操作简便。另外, 使用从细胞上清中用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS提取的细胞外囊泡作为标准品, 可对细胞培养上清样品中的细胞外囊泡进行定量检测。

【特点】

- 高灵敏度 (检测灵敏度可达WB的50~1,000倍)
- 可直接定性、定量细胞培养上清中的外泌体
- 节省分析过程中使用的外泌体量 (上样量为WB的1/10~1/1000以下)

【试剂盒组成】

试剂盒组分	包装
Exosome Capture 96 Well Plate	8 well × 12 strips / 1 plate
Reaction/Washing Buffer (10×)	50 mL × 2 vials
Exosome Binding Enhancer (100×)	10 mL × 1 vial
Control Primary Antibody Anti-CD63 (100×)	120 µL × 1 vial
Secondary Antibody HRP-conjugated Anti-mouse IgG (100×)	120 µL × 1 vial
TMB Solution	12 mL × 1 vial
Stop Solution	12 mL × 1 vial
Plate Seal	4 sheets
Instruction Manual	1 copy

【产品图片】



【应用】

(1) 定性分析从细胞培养上清和体液样品中提取的细胞外囊泡

使用任意细胞外囊泡表面标记蛋白的小鼠单抗作为检测一抗, 可以高灵敏度定性分析MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS所提取到的细胞培养上清或体液样品中的细胞外囊泡表面标记蛋白。

(2) 定量分析细胞培养上清中的细胞外囊泡

用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒从细胞培养上清中提取的细胞外囊泡作为标准品, 任意细胞外囊泡表面标记蛋白的小鼠单抗为检测一抗, 可定量细胞培养上清样品中的任意标记蛋白阳性细胞外囊泡。

※ 试剂盒中的对照检测一抗——Control Primary Anti CD63, 可检测人CD63, 但不能检测小鼠、大鼠、牛的CD63。若想检测除人CD63以外的表面标记蛋白, 请选用合适的小鼠单抗。

※ 试剂盒中的检测二抗——Secondary Antibody HRP-conjugated Anti mouse IgG, 与样品中的小鼠IgG发生强烈的非特异性反应, 与人IgG、大鼠IgG发生的非特异性反应较弱, 因此定量分析这些物种的血清或血浆样品时, 不建议使用IgG。

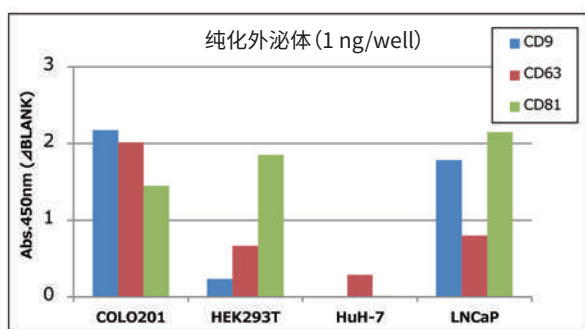
应用数据

从各种细胞培养上清提取细胞外囊泡的定性分析

将1 ng从各种细胞培养上清中提取的细胞外囊泡添加至孔中,使用能识别表面标记蛋白CD9、CD63、CD81的一抗通过本试剂盒对各表面标记量进行定性比较。

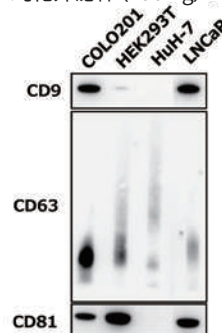
另外,作为比较参考数据,将150 ng从各细胞培养上清提取的细胞外囊泡进行电泳,使用能识别表面标记的CD9、CD63、CD81的一抗对各表面标记蛋白量以Western blotting进行定性分析。

<提取外泌体 (1 ng/well) 的定性比较数据>



<参考比较数据>

纯化外泌体 (150 ng)



■ 检测抗体

<ELISA>

抗CD9小鼠单抗 (M-L13)

BD Bioscience

抗CD63小鼠单抗 (H5C6)

BD Bioscience

抗CD81小鼠单抗 (JS-81)

BD Bioscience

<WB>

抗CD9兔多抗

System Bioscience

抗CD63小鼠单抗 (8A12)

Cosmo Bio

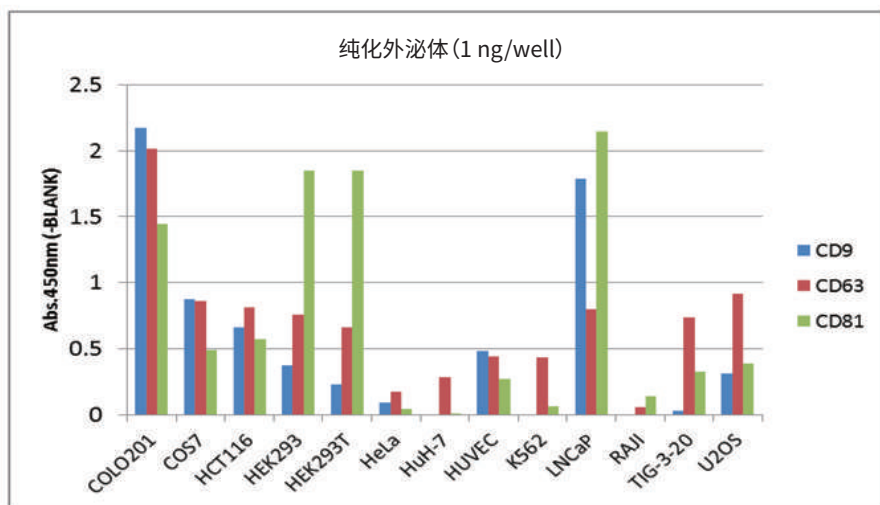
抗CD81小鼠单抗 (1D6)

Novus (产品编号: 559-30131)



在ELISA系统和WB之间, 标记蛋白的表达模式具有相关性。

参考数据: 从各种细胞培养上清中提取的细胞外囊泡的定性分析



分别使用1 ng各种细胞的培养上清液来源纯化外泌体(使用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒 PS提取),使用外泌体标记蛋白CD9、CD63、CD81对应的抗体,进行表达分析。

细胞株不同, 表达量完全不同!

有的细胞株中可能存在对特定标记蛋白的表达较少的外泌体。

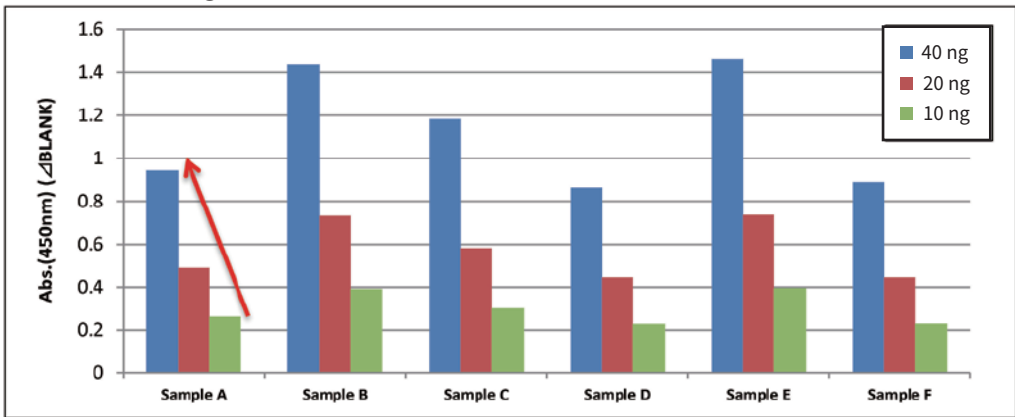


应用数据

从正常人血清中提取的细胞外囊泡的定性分析

从正常人血清的6个样品分别提取细胞外囊泡，通过BCA法算出细胞外囊泡膜上的蛋白浓度。分别添加40、20、10 ng的细胞外囊泡到孔中，用可识别表面标记CD63的对照组检测一抗（试剂盒配套）对检测的OD值进行定性比较。

<提取外泌体 (1 ng/well) 的定性比较数据>

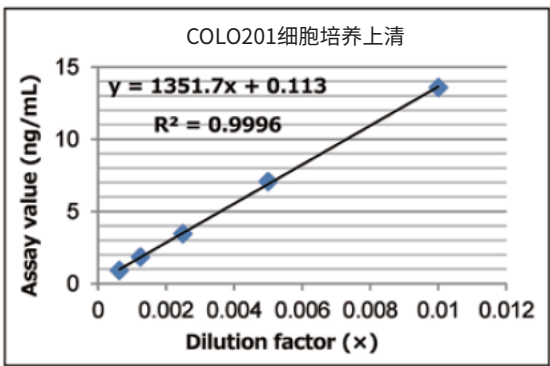


使用从体液样品纯化的细胞外囊泡具有良好的线性！



从细胞培养上清中提取细胞外囊泡的稀释线性 (Linearity) 参考数据

用从COLOC201细胞培养上清中提取的细胞外囊泡作为标准品制作标准曲线，评价COLOC201细胞培养上清样品的5个稀释度 (1:100-1:1600) 的线性。



COLOC201细胞培养上清					
细胞上清量 (μL)	稀释		测定值 (ng/mL)	期望值 (ng/mL)	预期百分比
	比例	稀释因子 (×)			
0.0625	1:1,600	0.000625	0.89	0.91	98.4
0.125	1:800	0.00125	1.82	1.72	105.6
0.25	1:400	0.0025	3.44	3.52	97.8
0.5	1:200	0.005	7.04	6.78	103.9
1	1:100	0.01	13.6	-	-



可以确认到良好的稀释线性以及可检测出0.1 μL细胞外囊泡。

应用数据

检测不同接种细胞数和不同培养时间的培养基中的细胞外囊泡

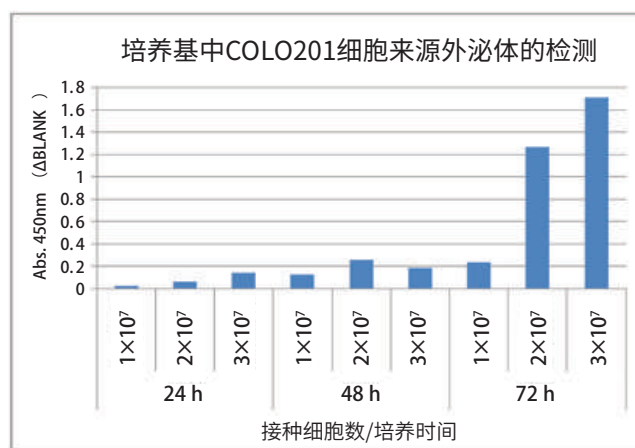
在T75细胞培养瓶中接种 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 的COLO201细胞，培养72 h。每24 h回收一部分的培养上清样品，用PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒（抗小鼠IgG POD）和试剂盒配套的Control Primary Antibody Anti CD63(100×)进行CD63的吸光度检测。

准备4 μ L的细胞培养上清，用添加了Exosome Binding Enhancer的反应液/清洗液（1×）稀释至100 μ L。

- 检测样品：COLO201细胞培养上清（25倍稀释）
- 接种细胞数： 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 个细胞/瓶
- 培养时间：24h、48h、72h
- 一抗：抗CD63抗体



只需使用4 μ L的细胞培养上清液，就可直接检测细胞外囊泡量，在讨论新型的细胞株的培养条件时，省去了讨论条件的时间。可以简单方便地讨论如何分泌最多的细胞外囊泡的条件。



添加药物后引起细胞外囊泡数量的变化

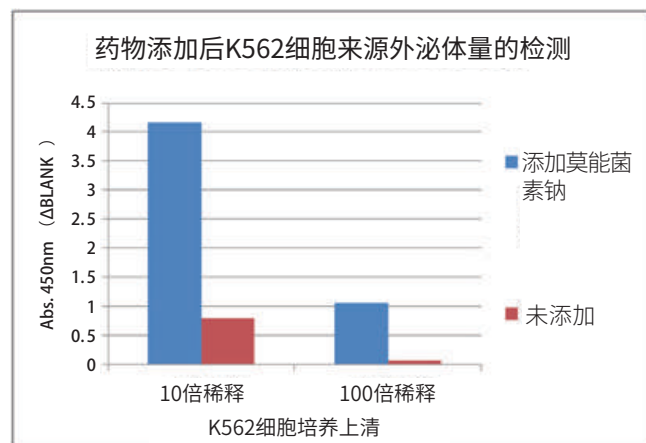
在T225培养瓶接种K562细胞，以无血清培养基培养72 h。之后更换添加终浓度为10 μ mol/L的莫能菌素钠和不含莫能菌素钠的无血清培养基，再培养24 h。培养后回收培养上清样品，用PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒（抗小鼠IgG POD）和试剂盒配套Control Primary Antibody Anti CD63（100×），检测CD63的吸光度。

用添加了Exosome Binding Enhancer的反应液/清洗液（1×）稀释回收后的细胞培养上清，分别作为10倍稀释和100倍稀释的细胞培养上清样品。

- 检测样品：K562细胞培养上清
（更换含莫能菌素钠的培养基和对照培养基后培养24 h）
- 一抗：抗CD63抗体



无需提取，可取少量培养基测定培养过程中的外泌体量。
还可以检测培养过程中外泌体量随时间变化而产生的变化，由于可以测定外泌体变化量的数值，因此比WB法检测更容易判断外泌体量的变化，十分方便。



应用数据

COLO201细胞培养上清来源和人血清来源的外泌体灵敏度检测比较

制备下列①~⑥的样品，比较用PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒、Company A ELISA试剂盒、Company A ELISA试剂盒（高灵敏度）检测外泌体标记蛋白CD63时的灵敏度。

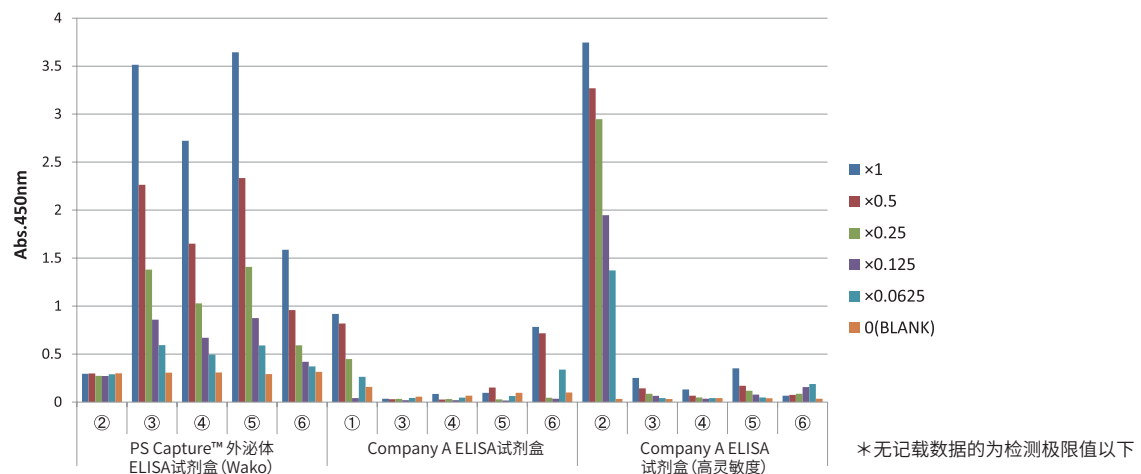
【使用样品内容】

- ① Company A ELISA试剂盒配套标准品
- ② Company A ELISA试剂盒（高灵敏度）配套标准品
- ③ 用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS提取COLO201细胞培养上清来源的外泌体
- ④ 用聚合物沉淀法提取COLO201细胞培养上清中的外泌体
- ⑤ MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS提取人血清来源外泌体
- ⑥ 聚合物沉淀法提取人血清来源外泌体

【稀释倍数和蛋白浓度】

	①	②	③	④	⑤	⑥
×1	1/16	1/1000	40 ng/mL	160 ng/mL	800 ng/mL	2000 µg/mL
×0.5	1/32	1/2000	20 ng/mL	80 ng/mL	400 ng/mL	1000 µg/mL
×0.25	1/64	1/4000	10 ng/mL	40 ng/mL	200 ng/mL	500 µg/mL
×0.125	1/128	1/8000	5 ng/mL	20 ng/mL	100 ng/mL	250 µg/mL
×0.0625	1/256	1/16000	2.5 ng/mL	10 ng/mL	50 ng/mL	125 µg/mL
0 (BLANK)	0	0	0	0	0	0

各外泌体ELISA试剂盒检测灵敏度比较



*无记载数据的为检测极限值以下

【结果】

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒比Company A ELISA试剂盒和Company A ELISA试剂盒（高灵敏度）可更灵敏地检测到CD63。另外，Company A ELISA试剂盒和Company A ELISA试剂盒（高灵敏度）对各自试剂盒配套标准品的反应敏感，但对PS提取外泌体的反应性弱。

由此证明，PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒在检测外泌体表面CD63比Company A ELISA试剂盒和Company A ELISA试剂盒（高灵敏度）更具特异性和高灵敏度。

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)

产品概要及特点

本试剂盒可用于细胞培养上清和体液样品中细胞外囊泡的定性分析以及定量分析。

上述的PS Capture™ 外泌体ELISA 试剂盒 (抗小鼠 IgG POD, 产品编号: 297-79201) 仅可使用小鼠单抗作为一抗, 但本试剂盒可以与生物素标记的任意物种的抗体和凝集素等作为一抗。另外本试剂盒使用HRP标记链霉亲和素作为二抗, HRP标记链霉亲和素与血液成分的非特异性结合很少, 所以可高灵敏度地检测到PS Capture™ 外泌体 ELISA 试剂盒 (抗小鼠 IgG POD) 难以检测的血液样品中的细胞外囊泡。

【使用样品内容】

- 高灵敏度定性分析 (能够以WB的50~1,000倍的灵敏度进行检测)
- 可以直接相对定量细胞培养上清和体液中的细胞外囊泡
- 适用于各种动物种来源抗体和凝集素等的检测系统
- 可以节约分析用的细胞外囊泡量 (上样量为WB的1/10~1/1000以下)

【试剂盒组成】

试剂盒组成 (96次用)	容量
Exosome Capture 96 Well Plate	8 well × 12 strips/1 plate
Reaction Buffer	80 mL × 1 vial
Washing Buffer (10×)	100 mL × 1 vial
Exosome Binding Enhancer (100×)	10 mL × 1 vial
Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 (100×)	120 µL × 1 vial
HRP-conjugated Streptavidin (100×)	240 µL × 1 vial
TMB Solution	12 mL × 1 vial
Stop Solution	12 mL × 1 vial
Plate Seal	4 sheets
Instruction Manual	1 copy

【对应样品】

样品	定性分析	定量分析
细胞培养上清	✓	✓
体液样品	✓	✓

【应用】

(1) 定性分析细胞培养上清以及体液样品中提取的细胞外囊泡

通过使用抗任意细胞外囊泡表面标记蛋白的生物素标记抗体作为一抗, 可以高灵敏度地检测出细胞培养上清和体液样品中的细胞外囊泡, 以及使用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS (产品编号: 293-77601) 提取的样品中的细胞外囊泡表面标记蛋白的定性分析。

(2) 定量分析细胞培养上清以及体液样品中的细胞外囊泡

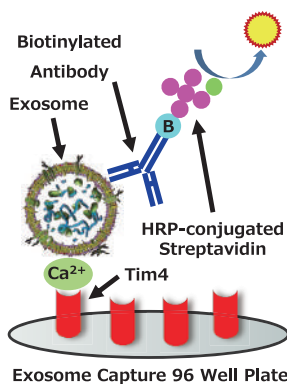
通过使用带任意表面标记蛋白的纯化细胞外囊泡为标准品制作标准曲线, 可以相对定量细胞培养上清以及体液样品中的带任意表面标记蛋白的细胞外囊泡。

※ 试剂盒的对照生物素标记抗体Control Biotinylated Antibody Anti-CD63可检测人CD63, 但是无法检测小鼠, 大鼠, 牛CD63。若要检测人CD63以外的表面标记蛋白, 请选用合适的生物素标记抗体。

【检测原理】

外泌体捕获96孔板预包被了与细胞外囊泡 (EV) 表面上的磷脂酰丝氨酸 (PS) 特异性结合的Tim4蛋白, 可在Ca²⁺

存在条件下捕获EV。然后用EV表面标志蛋白的生物素化抗体用作一抗, 并将HRP缀合的链霉抗生物素作为二抗检测。



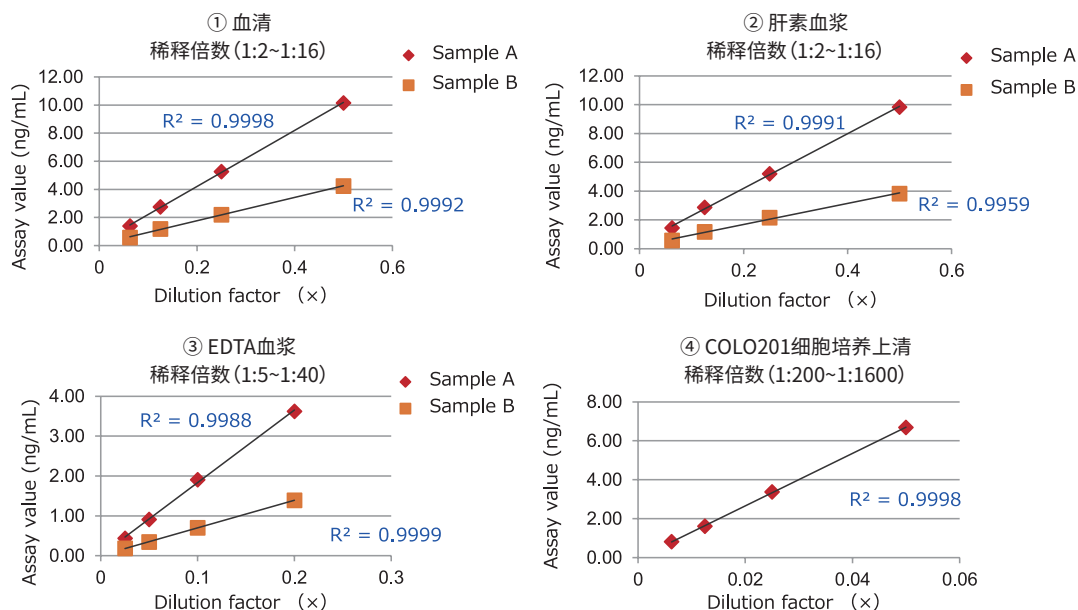
【产品图片】



应用数据

血液样品以及培养上清样品的稀释线性

用从COLO201细胞培养上清中纯化的细胞外囊泡制成的标准曲线为基准, 检测①人血清稀释样品, ②人肝素血浆稀释样品, ③人EDTA血浆稀释样品 (各2个样品, 4个梯度稀释) 以及④COLO201细胞培养上清进行4个梯度稀释的样品中的外泌体浓度 (检测CD63), 评价各个样品的稀释线性。



血清和肝素血浆样品在大于2倍的稀释度下可获得良好的线性。EDTA血浆样品在5倍以上稀释度下可获得良好的线性。

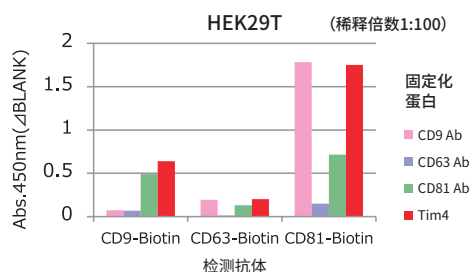
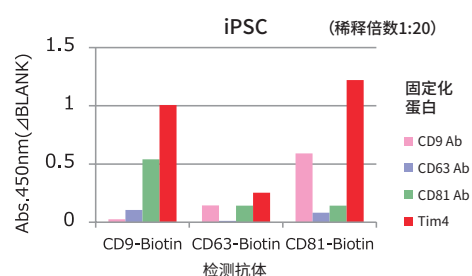
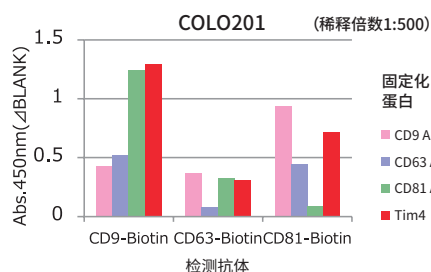
PS亲和法和抗体法捕获能力的比较

将预处理完成^{※1}的各细胞培养上清添加至已分别固定化的抗CD抗体 (CD9、CD63、CD81) 或Tim4微孔板的各个孔中进行反应。然后, 用各个生物素标记抗CD抗体 (CD9、CD63、CD81) 检测结合的外泌体。

※1 预处理条件: 10,000×g, 30 min



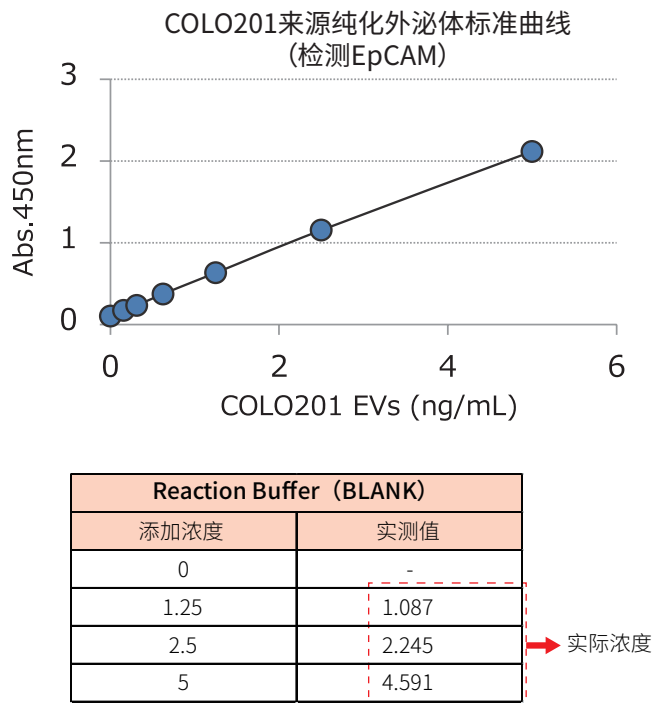
PS亲和法与抗体法相比, 更高效率地捕获到了各种细胞株来源的外泌体。



应用数据

COLO201来源纯化外泌体的加标回收实验【EpCAM】

使用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS (产品编号: 293-77601) 从COLO201细胞培养上清中分离和纯化外泌体, 将所提取的外泌体分别添加至已经过预处理^{※2}的混合正常人血清、EDTA血浆或肝素血浆中。利用生物素标记EpCAM^{※3}抗体 (MBL) 检测不同浓度的样品中的外泌体。然后利用COLO201细胞来源纯化外泌体制备的标准曲线, 计算出添加至各个样品中的外泌体的回收率。



血清 (稀释倍数: 1:2)				
添加浓度	实测值	回收值	回收率	
ng/mL	ng/mL	ng/mL	%	Mean
0	0.381	-	-	-
1.087	1.418	1.037	95	91
2.245	2.377	1.996	89	
4.591	4.429	4.048	88	

ECTA血浆 (稀释倍数: 1:2)				
添加浓度	实测值	回收值	回收率	
ng/mL	ng/mL	ng/mL	%	Mean
0	1.861	-	-	-
1.087	2.945	1.084	100	94
2.245	3.898	2.037	91	
4.591	6.007	4.146	90	

肝素血浆 (稀释倍数: 1:2)				
添加浓度	实测值	回收值	回收率	
ng/mL	ng/mL	ng/mL	%	Mean
0	0.433	-	-	-
1.087	1.524	1.091	100	96
2.245	2.566	2.133	95	
4.591	4.719	4.286	93	

以EpCAM作为检测对象时, 加标回收率在100%±10%的范围内, 显示出良好的回收性能。

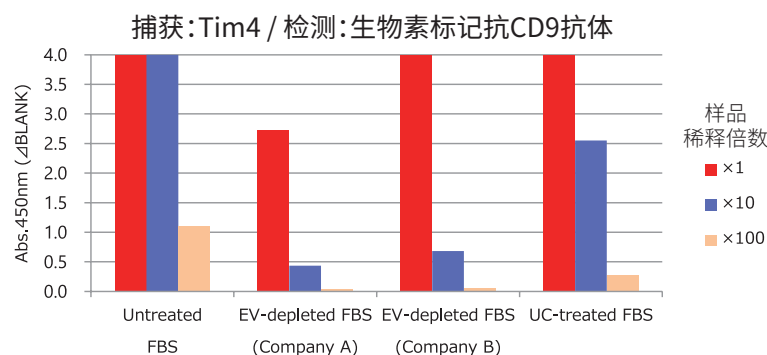
※2 预处理条件: 10,000×g, 30 min

※3 EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule



确认去外泌体血清中残留的细胞外囊泡

用生物素标记抗CD9抗体^{※5}检测未处理的FBS、市售的“无外泌体血清”(EV-depleted FBS)以及超离处理的FBS (UC-treated FBS)^{※4}中残存的细胞外囊泡。



使用PS亲和ELISA体系, 可以简单便利地检测到外泌体残留量。

※4 超离条件: 160,000×g, 16 h

※5 以Biotin Labeling Kit-SH (产品编号: 348-90941) 对抗CD9抗体 (产品编号: 014-27763) 进行标记。



应用数据

应用于糖链分析:rBC2LCN凝集素和Tim4双抗夹心ELISA

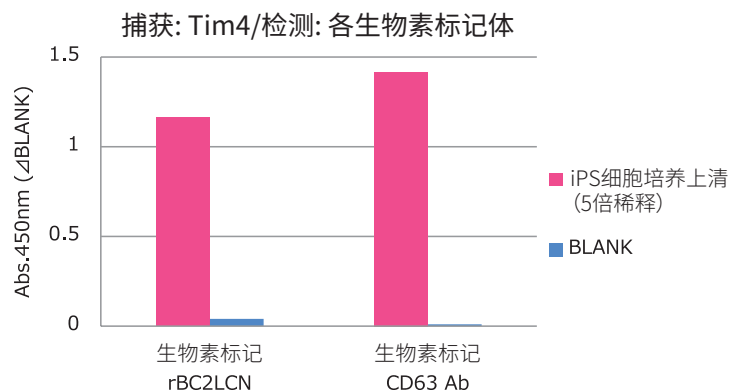
用生物素标记抗CD63抗体(产品编号:019-27713)和生物素标记rBC2LCN凝集素^{※6}检测已经过预处理^{※7}的5倍稀释iPS细胞培养上清中的外泌体。

※6 人ES细胞以及iPS细胞的未分化标记, 识别Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc (GlcNAc)。

以EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (ThermoFisher) 标记rBC2LCN (产品编号:029-18061)。

※7 预处理条件: 10,000 × g, 30 min

参考文献: S. Saito, *et al.*, *Sci. Rep.*, **8**, 3997 (2018)

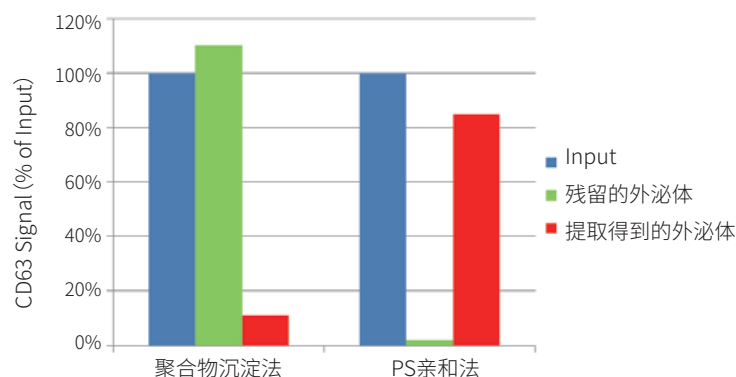


通过与各种凝集素相组合, 可用于分析外泌体表面上的糖链。



与聚合物沉淀法比较回收率

用PS亲和法(PS)以及聚合物沉淀法(Company A)从1 mL已经过预处理^{※8}的COLO201细胞培养上清中分离和纯化外泌体后, 用PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒(链霉亲和素HRP)检测外泌体标记CD63的信号。通过不同样品的吸光度来比较分离后残留在样品中的外泌体和提取得到外泌体的回收率。



※8 预处理条件: 10,000 × g, 30 min

<回收率的计算方法>

input: 使用稀释100倍的细胞培养上清的检测值^{※I}

残留的外泌体: 使用纯化后的稀释100倍的细胞培养上清的检测值^{※I}

提取到的外泌体: 使用稀释100倍的纯化样品的检测值^{※II}

※I 已确认稀释100倍在检测范围内。请在初步研究中用ELISA检测中计算出每个样品合适的稀释率。

※II 本试剂盒以及用聚合物试剂纯化的外泌体已10倍浓缩。

(eg. Input: 1 mL → 纯化外泌体: 100 μ L)

因此, 浓缩倍数乘以ELISA稀释倍数的值就是纯化外泌体样品的ELISA检测中的稀释倍数。



使用可以高灵敏度检测外泌体的PS ELISA系统, 可以简单地比较外泌体回收方法的效率和验证重复性。

PS Capture™ 外泌体流式试剂盒

产品概要及特点

本产品通过运用磷脂酰丝氨酸(PS)特异性结合的Tim4蛋白质和磁珠的新型亲和法,可将细胞外囊泡捕获到磁珠上面,通过流式细胞仪高灵敏检测表面标记蛋白。无需从细胞培养上清和体液样品中提取细胞外囊泡,即可直接定性分析表面标记蛋白。

需要另行购买表面标记蛋白对应一抗和荧光素标记的二抗,或荧光素直标的一抗。

【特点】

- FCM的高灵敏度定性分析
- 使用磁珠操作简单
- 可以直接检测样品(无需纯化)
- 从分离到染色只需3 h

【样品类型】

- 细胞培养上清
- 血清
- 血浆(肝素或EDTA)

【试剂盒组成】

试剂盒组成 (300次用)	容量
Exosome Capture Beads	3 mL×1 bottle
Washing Buffer(10 ×)	45 mL×2 bottles
Exosome Binding Enhancer(100 ×)	15 mL×1 bottle

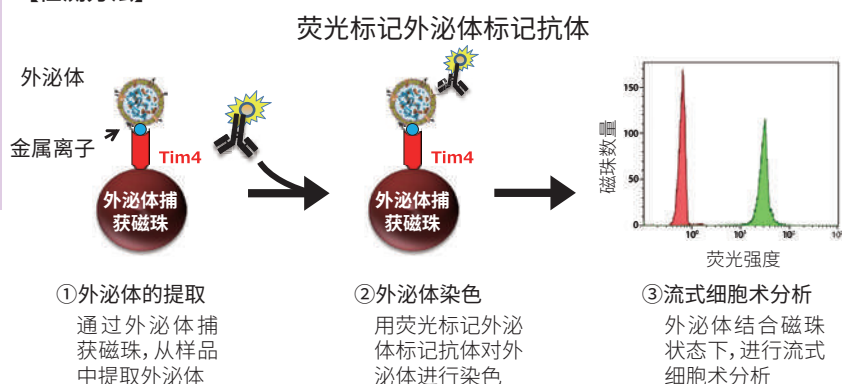
【各反应数量中试剂以及样品的使用量】

若想要扩大反应规模,外泌体捕捉磁珠的添加量及样品量请按照下表进行放大。

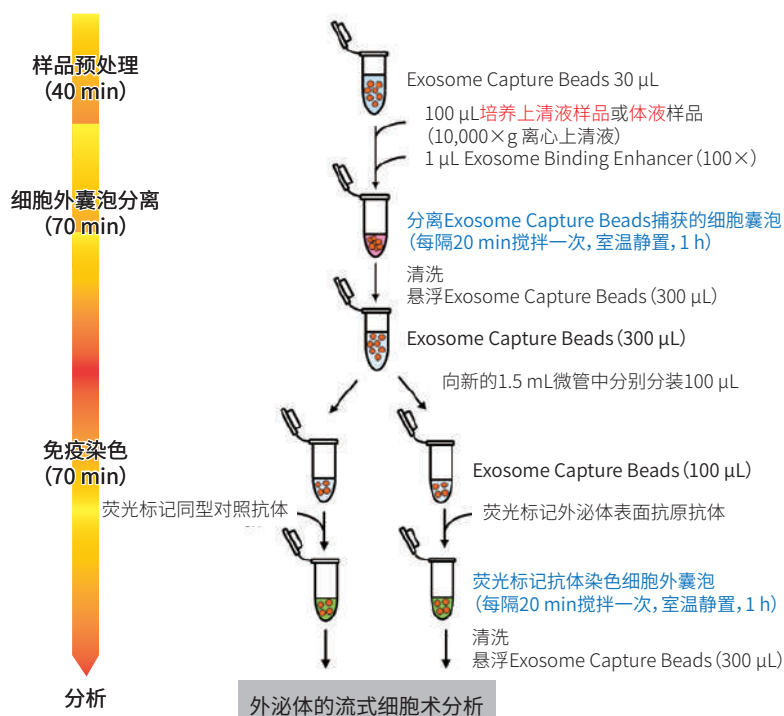
※每个1.5 mL EP管最大反应次数为10次反应。

反应数	Exosome Capture Beads (μL)	样品量 (μL)
2次反应 (基本)	30	100
3次反应	40	133
4次反应	50	167
5次反应	60	200
6次反应	70	233
7次反应	80	267
8次反应	90	300
9次反应	100	333
10次反应	110	367

【检测方法】

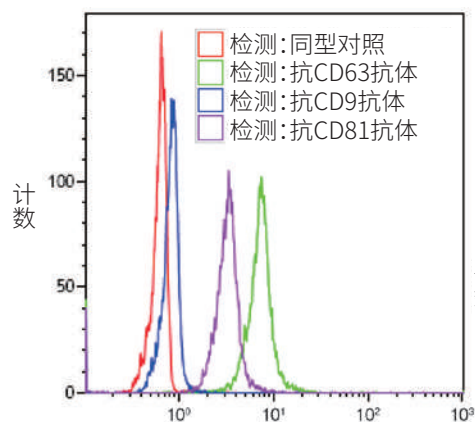


实验流程 (2次反应)



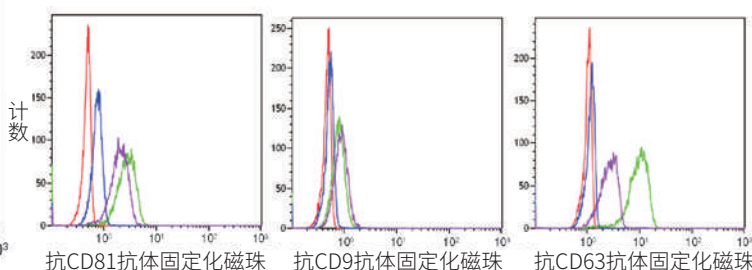
应用数据

分析K562细胞培养上清中外泌体的表面抗原



PS Capture™ 外泌体流式试剂盒

用本产品或其他公司产品 (抗CD81、CD9、CD63抗体固定化磁珠) 分离K562细胞培养上清中的外泌体, 与荧光标记抗CD63、CD9、CD81抗体结合后, 通过流式细胞仪分析外泌体表面抗原。

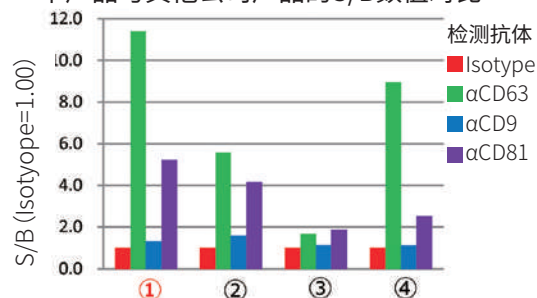


抗CD81抗体固定化磁珠

抗CD9抗体固定化磁珠

抗CD63抗体固定化磁珠

本产品与其他公司产品的S/B数值对比



S/B=Signal/Background比例, 以Isotype Control的信号值作为1进行比较

上述检测抗体均表明, 本产品比其他公司产品检测外泌体表面抗原的灵敏度更高。

① PS Capture™ 外泌体流式试剂盒

② 其他公司产品: 抗CD81抗体固定化磁珠

③ 其他公司产品: 抗CD9抗体固定化磁珠

④ 其他公司产品: 抗CD63抗体固定化磁珠

■ 样品

K562细胞的细胞培养上清液: 33 μ L/Assay

■ 检测抗体

PE-anti-CD63 (BD Biosciences)

PE-anti-CD9 (Novus Biologicals)

PE-anti-CD81 (Novus Biologicals)

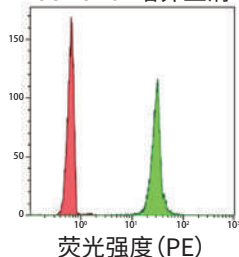
分析COLO201细胞培养上清、人血清、人血浆 (EDTA血浆、肝素血浆) 所含外泌体表面抗原

用本产品固定COLO201细胞培养上清、人血清、人血浆 (EDTA血浆、肝素血浆) 所含有的外泌体, 通过PE标记小鼠IgG同型对照或PE标记抗人CD9抗体对外泌体进行检测。

● 样品: COLO201细胞培养上清、人血清、人血浆 (EDTA血浆, 肝素血浆) 各100 μ L

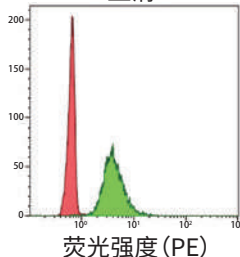
● 检测: PE标记抗CD9抗体

COLO201培养上清



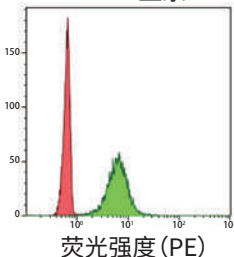
荧光强度 (PE)

血清



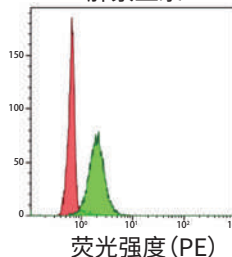
荧光强度 (PE)

EDTA血浆



荧光强度 (PE)

肝素血浆



荧光强度 (PE)

■ PE标记小鼠IgG同型对照检测 (阴性对照)

■ PE标记抗CD9抗体检测

全部样品通过PE标记抗人CD9抗体染色, 都可观察到荧光强度峰值的变化。从该结果可判断, 本产品可以检测出细胞培养上清、血清、血浆中的外泌体。

外泌体标记抗体

产品概要及特点

四次跨膜蛋白 (Tetrapanin) 家族如CD9、CD63、CD81被用作外泌体的标记蛋白。Wako根据DNA免疫法*构建了高灵敏度的单克隆抗体。这些抗体可应用于Western blotting、流式细胞术、ELISA和免疫沉淀等外泌体分析。

【特点】

- 高灵敏度
- 高性价比
- 高特异性
- 识别非还原样品

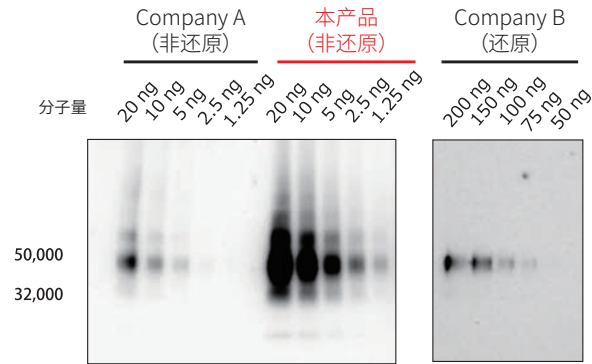
抗原		CD63	CD9	CD81
克隆号		43537	1K	17B1
免疫动物		小鼠	小鼠	小鼠
抗体亚型		IgG1	IgG1	IgG2b
交叉性	人	○	○	○
	牛	×	○	○
	小鼠	×	×	×
	大鼠	×	×	×
应用		Western blotting 流式细胞术 ELISA 免疫沉淀	Western blotting 流式细胞术 ELISA 免疫沉淀	Western blotting 流式细胞术 ELISA 免疫沉淀
产品系列		未标记抗体 荧光素结合抗体 红色荧光色素（635）结合抗体 生物素结合抗体	未标记抗体	未标记抗体

*DNA免疫法：

DNA免疫法是向动物转染靶蛋白表达载体，在动物体内表达靶蛋白以制备抗原并回收抗体。这种方法所制备的抗体识别天然状态的蛋白，故这种技术可用于制备治疗及诊断领域的抗体和膜蛋白抗体，以及中和功能性抗体等。

抗CD63, 单克隆抗体 (3-13)

从COLO201细胞培养上清中纯化外泌体，比较Western blotting的检测灵敏度。



本产品比Company A以及Company B产品更能高灵敏度地检测出CD63蛋白。

分离外泌体: MagCapture™外泌体提取试剂盒PS (产品编号: 293-77601)
电泳凝胶: SuperSep™ Ace, 5-20%, 17 wells (产品编号: 194-15021)
电泳缓冲液: SDS-PAGE 缓冲液, pH 8.5 (产品编号: 192-16801)
阻断剂: 3%脱脂奶粉/ PBS-T
发光试剂: ImmunoStar® Zeta (产品编号: 295-72404)
一抗: 1,000倍稀释
二抗: 抗小鼠IgG (H+L), 过氧化物酶结合, 10,000倍稀释
(Company B使用的是该产品配套的二抗)

抗CD63, 单克隆抗体 (3-13), 荧光素结合

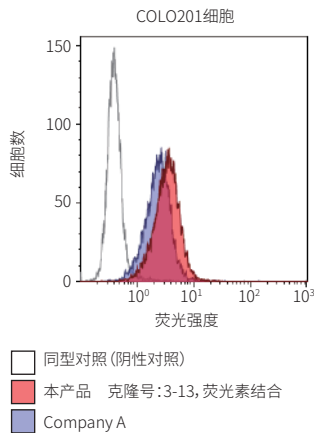
Ex/Em = 494 nm/521 nm

■ COLO201细胞的FCM分析

使用本产品进行COLO201细胞悬浮液的流式细胞术分析。

样品(细胞)量: 1×10^6 个

抗体量: 10 μ L (1次量)

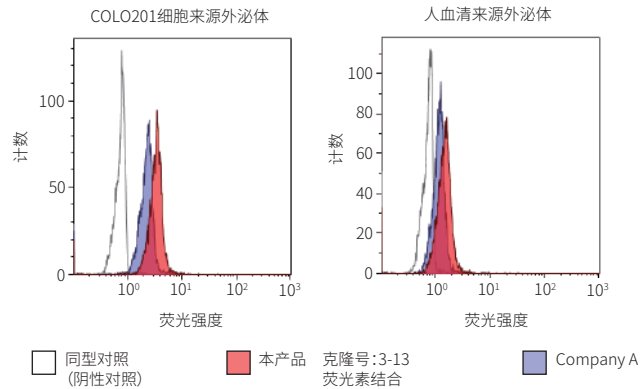


■ 检测COLO201细胞培养上清以及人血清中所含外泌体的CD63

用PS Capture™ 外泌体流式试剂盒(产品编号: 297-79701)从已经过预处理* 的COLO201细胞培养上清及人血清分离得到外泌体, 然后用本产品或Company A产品进行流式细胞术分析。

※预处理条件: $10,000 \times g$, 30 min

样品(细胞培养上清/血清)量: 33 μ L



本产品和Company A产品相比, 可以高灵敏度地检测到COLO201细胞表面以及外泌体表面的CD63。



抗CD63, 单克隆抗体 (3-13), 红色荧光色素 (635) 结合

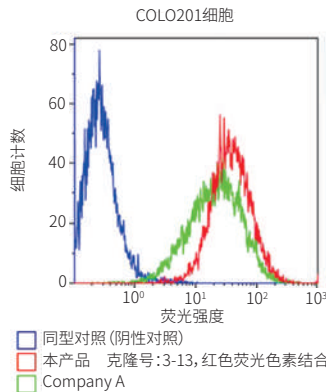
Ex/Em = 634 nm/654 nm

■ COLO201细胞的FCM分析

使用本产品对COLO201细胞悬液进行流式细胞术分析。

样品(细胞)量: 1×10^6 个

抗体量: 10 μ L (1次量)

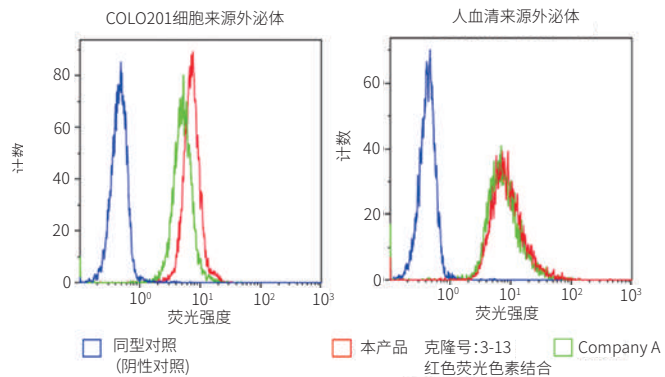


■ 检测COLO201细胞培养上清以及人血清来源外泌体的CD63

用PS Capture™ 外泌体流式试剂盒(产品编号: 297-79701)从已经过预处理* 的COLO201细胞培养上清(8倍稀释)及人血清中分离得到外泌体, 然后用本抗体或Company A产品进行流式细胞术分析。

※预处理条件: $10,000 \times g$, 30 min

样品(细胞培养上清/血清)量: 33 μ L



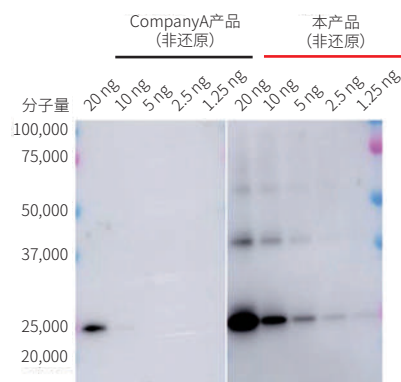
本产品和Company A产品相比, 可以高灵敏度地检测到COLO201细胞表面以及外泌体表面的CD63。



抗CD9, 单克隆抗体 (1K)

■ Western blotting分析

用本产品以及Company A产品检测MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS (产品编号:293-77601) 分离的COLO201细胞培养上清来源纯化外泌体 (1.25 ~ 20 ng)。



分离外泌体:MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS (产品编号:293-77601)

电泳凝胶:SuperSep™ Ace, 10-20%, 17 wells (产品编号:198-15041)

电泳缓冲液:SDS-PAGE 缓冲液, pH 8.5 (产品编号:192-16801)

阻断剂:3%脱脂奶粉/PBS-T

发光试剂:ImmunoStar® Zeta (产品编号:295-72404)

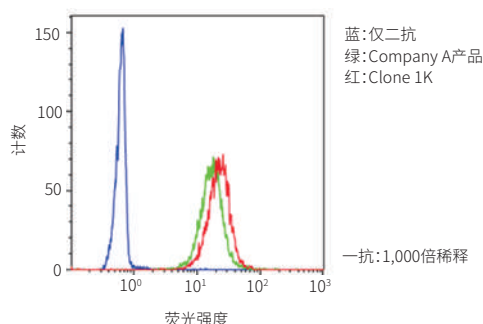
一抗:1,000倍稀释

二抗:抗小鼠IgG (H+L), 过氧化物酶结合, 10,000倍稀释

■ FCM分析

使用PS Capture™ 外泌体流式试剂盒 (产品编号: 297-79701) 分离已经过预处理*的8倍稀释COLO201细胞培养上清中所含的外泌体。与本产品或Company A产品以及荧光标记抗小鼠抗体 (产品编号: 569-79631) 结合后, 通过流式细胞术检测外泌体表面抗原。

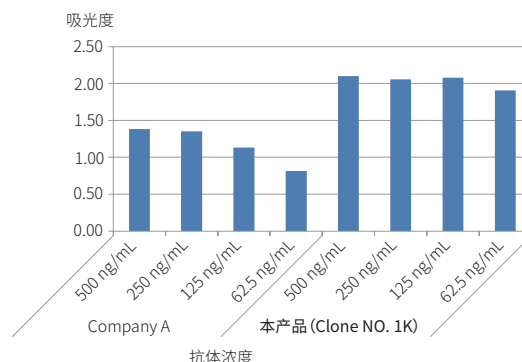
※预处理条件:10,000×g, 30 min



■ ELISA分析

从已经过预处理*的500倍稀释COLO201细胞培养上清中分离得到外泌体, 使用本产品或Company A产品作为一抗检测。除了一抗改用本抗体外, 其他试剂均使用了PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD) (产品编号:297-79201) 中的组分。

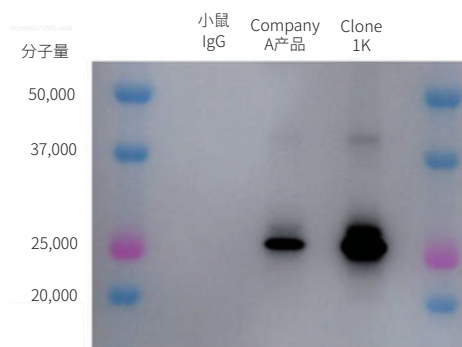
※预处理条件:10,000×g, 30 min



■ 免疫沉淀

用本抗体或 Company A 产品免疫沉淀已经过预处理*的 COLO201 细胞培养上清中的外泌体, 并用 HRP 标记抗 CD9 抗体 (Company B 产品) 检测。

※预处理条件:10,000×g, 30 min



电泳凝胶:SuperSep™ Ace, 10-20%, 17 wells (产品编号:198-15041)

电泳缓冲液:SDS-PAGE 缓冲液, pH 8.5 (产品编号:192-16801)

阻断剂:3%脱脂奶粉/PBS-T

发光试剂:ImmunoStar® Zeta (产品编号:295-72404)

HRP标记抗CD9抗体:1,000倍稀释

COLO201细胞培养上清:1 mL

抗体量:5 μg

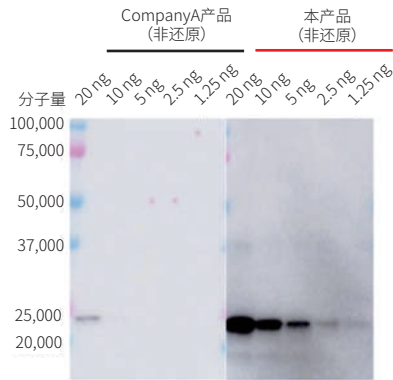


本产品可以高灵敏度地检测出外泌体表面的CD9, 还可以高效率地回收CD9阳性外泌体。

抗CD81, 单克隆抗体 (17B1)

■ Western blotting分析

用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS (产品编号:293-77601) 分离的COLO201细胞培养上清来源纯化外泌体 (1.25 ~ 20 ng), 分别用本产品及Company A产品对纯化的外泌体进行检测。

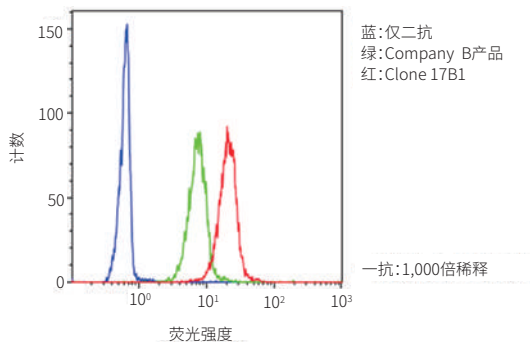


分离外泌体: MagCapture™ 外泌体提取试剂盒 PS (产品编号:293-77601)
 凝胶: SuperSep™ Ace, 10-20%, 17 wells (产品编号:198-15041)
 电泳缓冲液: SDS-PAGE 缓冲液, pH 8.5 (产品编号:192-16801)
 阻断剂: 3%脱脂奶粉/PBS-T
 发光试剂: ImmunoStar® Zeta (产品编号:295-72404)
 一抗: 2,000倍稀释
 二抗: 抗小鼠IgG (H+L), 过氧化物酶结合, 10,000倍稀释

■ FCM分析

使用PS Capture™ 外泌体流式试剂盒 (产品编号: 297-79701) 从已进行预处理*的8倍稀释COLO201细胞培养上清中分离得到外泌体。与本抗体或Company B产品以及荧光标记抗小鼠抗体 (产品编号:569-79631) 结合后, 通过流式细胞术检测外泌体表面抗原。

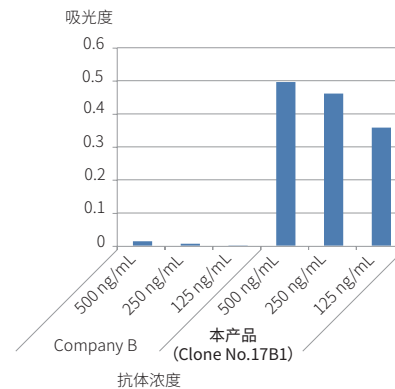
※预处理条件: 10,000×g, 30 min



■ ELISA分析

使用本产品或Company B产品作为一抗, 检测已经过预处理*的1,000倍稀释COLO201细胞培养上清中的外泌体。除了一抗改用本抗体外, 其他试剂均使用了PS Capture™ 外泌体ELISA 试剂盒 (抗小鼠IgG POD) (产品编号:297-79201) 中的组分。

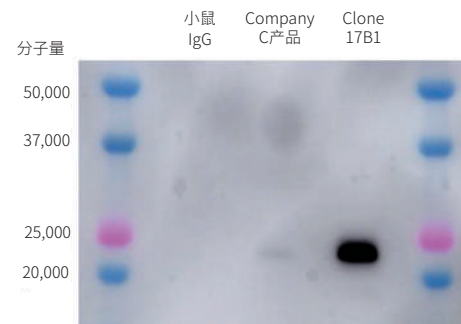
※预处理条件: 10,000×g, 30 min



■ 免疫沉淀

用本产品或Company C产品与已经过预处理*的COLO201细胞培养上清中的外泌体进行免疫沉淀, 并用HRP标记抗CD81抗体 (Company D产品) 进行检测。

※预处理条件: 10,000×g, 30 min



电泳凝胶: SuperSep™ Ace, 10-20%, 17 wells (产品编号:198-15041)
 电泳缓冲液: SDS-PAGE 缓冲液, pH 8.5 (产品编号:192-16801)
 阻断剂: 3%脱脂奶粉/PBS-T
 发光试剂: ImmunoStar® Zeta (产品编号:295-72404)
 HRP标记抗CD81抗体: 1,000倍稀释
 COLO201细胞培养上清: 1 mL
 抗体量: 5 µg



本产品不仅可以高灵敏地检测出外泌体表面的CD81, 还可以高效提取CD81阳性外泌体。

EV-Save™ 细胞外囊泡封闭试剂

产品概要及特点

本产品是一种聚合物试剂，可抑制样品管或枪头等实验耗材对细胞培养上清中细胞外囊泡的吸附作用。能防止实验和保存过程中由于吸附作用所引起的细胞外囊泡的损耗，提高回收率。可在超滤、提取和保存前向样品中加入本产品。

【特点】

- 强力抑制实验耗材对培养上清中或提取后的细胞外囊泡的吸附作用
- 用法简单，只需往样品中添加本品即可

【使用前提】

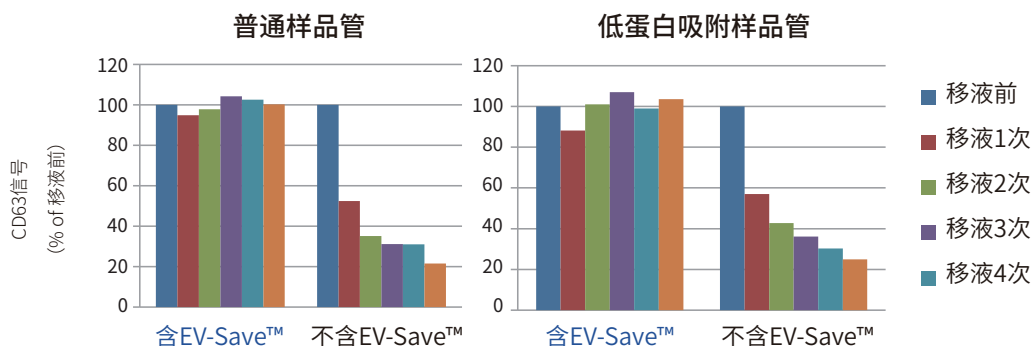
- 在血清、血浆或杂质较多的样品中，本品的使用效果会受到影响。
 - 本品含有聚合物。若担心聚合物会影响后续实验的结果，请不要使用本品。
- 已经证实以下实验中，添加EV-Save™ 没有影响：
1. NTA
 2. Western blotting
 3. ELISA
 4. qPCR Array
 5. 细胞培养

EV-Save™ 的吸附抑制效果-样品管-

使用EV-Save™，检验其对纯化外泌体样品管的吸附抑制效果。

【结果】

在普通样品管和低蛋白吸附样品管中，移液操作都会引起外泌体减少。而添加EV-Save™ 几乎能完全抑制移液引起的外泌体损耗。



【实验条件】

用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS (产品编号:293-77601) 从COLO201细胞的培养上清中分离外泌体。将3 ng/μL外泌体放在样品管中静置3 min。然后用移液器转移到其他样品管，重复本步骤4次以上。在含EV-Save™ 的实验组中，将EV-Save™ 按照1/100体积比添加到样品中，然后进行移液。使用PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD) (产品编号:297-79201) 检测外泌体的CD63信号，检测移液次数与外泌体损失比例的关系。将移液前的CD63信号设定为100%，相对值见图表。

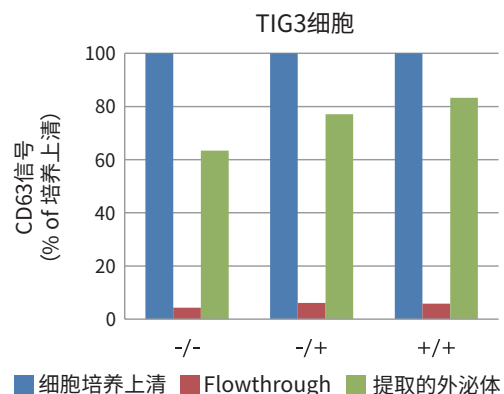
EV-Save™ 的吸附抑制效果 -同时使用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS-

【实验概要】

在利用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS从TIG3细胞培养上清中提取外泌体的过程中, 验证添加EV-Save™ 是否能抑制外泌体的损耗。

【结果】

添加了EV-Save™ 的TIG3的细胞培养上清及MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS配套的"Exosome Elution Buffer"实验组 (+/+), 比两者都没添加的实验组 (-/-), 外泌体的提取量增加了大约20%。



-/-: 培养上清没有添加EV-Save™/ "Exosome Elution Buffer"没有添加EV-Save™

-/+ : 培养上清没有添加EV-Save™/ "Exosome Elution Buffer"添加了EV-Save™

+/+ : 培养上清添加了EV-Save™/ "Exosome Elution Buffer"添加了EV-Save™

【实验条件】

使用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS, 分别从1 mL COLO201、TIG3和人iPS细胞的培养上清中提取外泌体。培养上清不进行超滤浓缩。外泌体纯化按以下条件分别进行, “往各培养上清中添加/不添加EV-Save™”, “往MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS配套的‘Exosome Elution Buffer’中添加/不添加EV-Save™”。

使用PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD) (产品编号: 297-79201) 检测外泌体的CD63信号作为外泌体量。假设细胞培养上清的CD63信号为100%, 相对值见图表。

EV-Save™ 的冷冻保护作用

【实验概述】

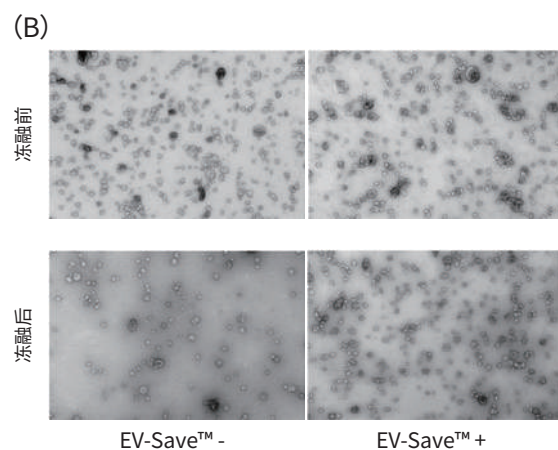
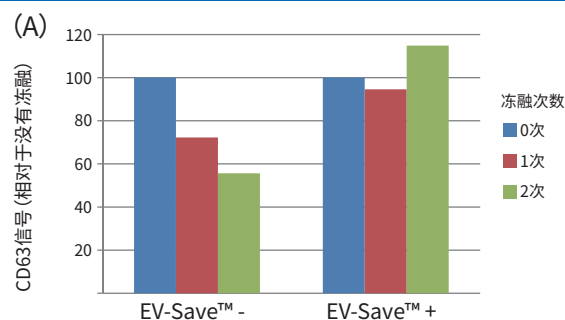
众所周知, 在反复冻融的条件下外泌体会受到破坏 (Witwer, K. W. *et al.*, 2013)。验证添加EV-Save™ 是否能抑制外泌体所受到的损伤。

【实验条件】

用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS提取COLO201细胞来源的外泌体, 然后进行冻融。再进行PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD) (产品编号: 297-79201) 检测 (图A), 和透射电子显微镜 (TEM) 分析 (图B)。

【结果】

冻融后CD63信号减弱, 但是添加 EV-Save™ 后这种减弱的情况得到抑制 (图A)。此外, 电子显微镜分析结果 (图B) 表明冻融导致了粒子数明显减少, 但是通过添加EV-Save™ 可以起到抑制粒子数减少的作用。



Q&A· 疑难解答

· MagCapture™外泌体提取试剂盒 PS

■ 试剂盒规格、功能	P.34
■ 与传统方法的比较	P.34
■ 试剂盒的操作方法、组成	P.34
■ 样品用量	P.35
■ 外泌体提取后的分析	P.35

■ 试剂盒规格、功能

Q1: 本提取方法的原理是什么?

本提取方法利用了Tim4蛋白对存在于以外泌体为代表的细胞外囊泡 (Extracellular Vesicles; EVs) 膜表面的磷脂酰丝氨酸 (以下称PS), 以金属离子依赖性的方式进行结合以提取外泌体等的细胞外囊泡。是无需使用抗体的亲和纯化法。

Q2: 可以提取哪些细胞外囊泡?

可提取PS暴露于脂质膜表面的外泌体和微囊泡。

Q3: 外泌体和微囊泡的区别是什么?

外泌体和微囊泡的区别在于其产生的方式不同。从晚期胞内体分泌的细胞外囊泡称为外泌体, 从细胞膜直接出芽产生的细胞外囊泡称为微囊泡。二者的大小也有所不同, 外泌体的粒子直径约40~100 nm, 微囊泡的粒子直径约100~1,000 nm, 但有报道发现也存在小直径的微囊泡, 所以无法从粒子大小来明确区分二者。

Q4: 外泌体和微囊泡可以分开提取吗?

如上面所述, 无法明确区分二者的大小, 所以无法将二者完全分开。推荐使用下列简便的提取方法以便获得各主要的组分: 提取外泌体等粒子直径小的细胞外囊泡 (Small EVs) 时, 请选用10,000×g离心后的上清样品; 提取含微囊泡在内的大粒子直径的细胞外囊泡 (Large EVs) 时, 首先要回收1,200×g离心的上清, 然后将其10,000×g离心分离获得的沉淀用TBS悬浮后作为样品使用。

如果同时提取上述两种细胞外囊泡, 请使用1,200×g离心分离的上清作为样品。

详细的样品的预处理条件请参考产品的使用说明书。

Q5: 会回收到外泌体、微囊泡以外的东西吗?

会回收到带包膜的病毒, 因为包膜病毒的膜表面也会暴露PS。利用这个特点也可以将本试剂盒应用于包膜病毒的提取实验。若想进一步分离出细胞外囊泡与包膜病毒, 使用本试剂盒提取后, 必须使用病毒特异性抗体进行亲和提取。本方法也适用于对包膜上有着CD63等外泌体标记的包膜病毒提取。

Q6: 有病毒纯化相关的引用文献吗?

在以下论文中, 报告了使用本方法的病毒纯化。

"Vesicle-Cloaked Virus Clusters Are Optimal Units for Inter-organismal Viral Transmission", M. Santiana, *et al.*, *Cell Host & Microbe*, **24**, 208-220 (2018)

Q7: 所有的外泌体都会暴露PS吗?

虽然没有证据表明所有的外泌体都暴露了PS, 但是在Wako的操作实例 (P.37 Q7 纯化结果以及检测结果) 中, 尚未发现无法检测的样品。

在以下的论文中报告了使用冷冻电子显微镜以及免疫金胶体颗粒的活化血小板来源细胞外囊泡的表型分析。据该论文报道, 约75%的活化血小板来源细胞外囊泡都会在其表面暴露PS。

"Extracellular vesicles from activated platelets: a semiquantitative cryo-electron microscopy and immuno-gold labeling study", B. Alain R, *et al.*, *Platelets*, **28** (3), 263-271 (2017)

Q8: 本试剂盒可以从哪些样品中提取外泌体?

Wako的操作实例中, 有使用过细胞培养上清、血清、肝素-血浆、EDTA血浆、尿液、粪便等作为提取样品。另外, 也有用户使用本试剂盒, 从脑脊髓液和唾液中提取外泌体。

■ 外泌体标记	P.35
■ 相关产品	P.35
■ 实验条件	P.35
■ 疑难	P.36

Q9: 1次实验所回收的外泌体量大概是多少?

实验样品的种类和体积不同, 回收到的外泌体量也大不相同。在Wako的操作实例中, 一次提取操作可获得约30 µg/mL的蛋白 (BCA法检测), 粒子数 $1\sim 2 \times 10^{10}$ (NanoSight LM10检测) (经莫能菌素钠刺激外泌体分泌的K562 培养上清5 mL浓缩为1 mL后, 对其进行纯化)。从1 mL正常人混合血清提取一次, 可回收约34 µg/mL蛋白 (BCA法检测), 粒子数约 5×10^9 /mL (NanoSight LM10检测)。本试剂盒最终可获得100 µL的洗脱液。

■ 与传统法的比较

Q10: 与超离相比的优势是什么?

与超离法相比, 本试剂盒能更简便地回收高纯度外泌体, 且重复性好, 回收率高。还能提取超速离心法难以沉淀的外泌体。

所提取的外泌体纯度高, 相当于超离法和密度梯度法相结合时得到的外泌体组分。

Q11: 与抗体亲和法相比, PS亲和法的优势是什么?

抗体亲和法使用外泌体表面抗原相对应的抗体, 必须用变性剂洗脱在酸性条件下分离提取外泌体。而本试剂盒是在中性环境下用整合剂来洗脱的, 能提取近乎完整的外泌体。由于洗脱过程无需使用变性剂, 磁珠非特异性吸附蛋白杂质少, 能回收更高纯度的外泌体, 且外泌体回收率更高。

标记蛋白的表达量随外泌体来源细胞的不同而有所差异, 传统抗体亲和法只能特异性识别一种外泌体表面标记蛋白, 与之相比, 本试剂盒可特异性识别膜脂质成分, 回收范围更广。另外, 有实例证明识别表面标记蛋白的抗体不能识别不同动物种抗原, 而本试剂盒能运用于大范围的动物物种中 (人, 小鼠, 牛等都有实例)。

Q12: 与聚合物沉淀法相比, 其优点是什么?

与聚合物沉淀法相比, 回收效率更高, 而且可提取更高纯度的外泌体。

■ 试剂盒的操作方法、组成

Q13: 操作本试剂盒耗时多久?

样品预处理约1 h, 试剂盒所有的步骤总计需要3.5 h。具体操作步骤包括: ①外泌体捕获磁珠的固定需要15 min; ②与样品反应需要3 h; ③外泌体的清洗和洗脱需要约35 min。可以将于样品反应的时间缩短至1 h, 但需要进行预实验确认对实验结果没有影响。

Q14: 本试剂盒需要特别慎重的操作吗?

① 外泌体捕获固定化磁珠与样品反应后的清洗步骤中, 最后需要彻底去除清洗液。

请务必确认完全去除清洗液后再进行洗脱操作;

② 洗脱步骤中向磁珠添加洗脱液后, 确保磁珠不发生凝集后需要彻底重悬。

Q15: 洗脱液的组成有哪些?

是含有1 mmol/L的整合剂、盐、防腐剂的Tris溶液。若以上成分阻碍后续分析, 请通过超滤 (Sartorius VivaSpin500, 截留分子量100K, 产品编号: VS0141) 或凝胶过滤替换合适的Buffer。

Q16: 外泌体捕获固定化磁珠可以循环利用吗?

可以。为了能够重复回收样品中残留的外泌体, 使用过的磁珠最多可再回收利用4次。试剂盒内缓冲液量充足, 如果是从同一样品中重复提取或实验对污染没要求, 10次用试剂盒最多可进行50次反应。如果样品体积大于1 mL或样品已浓缩, 建议可对磁珠进行回收循环利用。详情参考使用说明书。

但如果磁珠发生了聚集且无法用枪头打散, 请勿继续使用。

Q17:外泌体捕获固定化磁珠能保存吗？

可以。重复利用外泌体洗脱后的外泌体捕获固定化磁珠时，请使用试剂盒配套的Washing buffer 或自行配制的TBS冷藏保存 (Wako实例:2年)。

Q18:实验操作中有可以留到第二天的步骤吗？

外泌体捕获固定化磁珠与样品的反应步骤 (反应时间3 h) 反应过夜都没有问题 (置于4℃下)。

■样品用量

Q19:样品纯化所需的最低量是多少？

为了稳定地让磁珠和样品混合，使用**旋转混合仪**反应时请准备500 μL以上的样品，使用**试管混合器**时请准备100 μL以上的样品。若使用的样品量比上述的少时，请添加TBS至高于最低上样量，再与外泌体捕获固定化磁珠反应。另外，用于补平的TBS推荐添加EV-Save™。

Q20:可以从大量的样品中回收吗？

浓缩后可再回收。如果是培养上清的情况下，最多可以从50 mL的样品中提取外泌体。请将离心分离预处理后的50 mL细胞培养上清超滤浓缩至1 mL (推荐超滤管:Sartorius Viva Spin20 截留分子量 100 K、产品编号:VS2041)。可兼容无血清培养基及含10% FBS的培养基。由于血清样品无法浓缩，最多只能用1 mL的样品。详情参考产品说明书。
另外，通过超滤浓缩外泌体会吸附在容器或滤膜上而减少。在进行超滤时，请添加EV-Save™ 细胞外囊泡吸附抑制剂 (产品编号:058-09261)，防止吸附损失。但是由于EV-Save™ 含有聚合物，不建议用于蛋白组学分析的样品。

Q21:超滤浓缩中推荐使用组分分子量100 K, 可以使用10 K吗？

Wako经过比较100 K, 300 K, 1000 K的超滤管，从浓缩时间和浓缩的外泌体量的结果来看，推荐使用100 K。虽然10 K和30 K也可以使用，但是浓缩时间可能会变长。另外若培养基含有可被浓缩的白蛋白，可能会降低回收效率。

■外泌体提取后的分析

Q22:外泌体中含有什么？

含有蛋白质、脂质、核酸 (DNA、microRNA、mRNA) 等。

Q23:提取后的细胞外囊泡可用于什么分析？

因为提取的细胞外囊泡是完整状态，所以可以使用所有的分析方法。
(例) · 蛋白分析:蛋白电泳、Western blotting、质谱分析、流式细胞术、ELISA等。
· 核酸分析如:qPCR、微阵列 (生物芯片)、二代测序等
· 粒子分析:电镜分析，外泌体浓度粒径分析 (NTA) 等
· 功能分析:体内外的注射实验等

Q24:提取后的细胞外囊泡 (EVs) 能直接用于细胞的摄取实验中吗？

由于试剂盒配套的洗脱缓冲液中的防腐剂有细胞毒性，请另行制备含2 mmol/L EDTA的PBS缓冲液作为洗脱缓冲液。获得的纯化细胞外囊泡样品用针头式过滤器 (Millipore Ultrafree-MC, GV 0.22 μm sterile, 产品编号:UFC30GV0S) 进行除菌，用于细胞摄取实验等。**甚至为防止吸附而添加了EV-Save™ 的细胞外囊泡样品，也可直接用于实验。**

Q25:电镜分析需要的外泌体量是多少？

Wako在电镜分析中使用2~4×10¹⁰ particles/mL粒子浓度 (用NanoSight LM10检测) 的样品。

Q26:微阵列分析需要的外泌体量是多少？

Wako从下述的粒子数 (用NanoSight LM10检测) 的外泌体中提取RNA，进行微阵列分析。
COL0201: 4.6×10¹⁰ particles
TIG3: 1.7×10¹⁰ particles
iPS: 1.9×10⁹ particles

Q27:蛋白组学分析需要的外泌体量是多少？

P.12的蛋白组学分析 (W. Nakai, *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 33935, 2016) 中，使用了约1 μg的纯化外泌体。该外泌体来源于约1.5 mL的K562细胞培养上清样品。该样品以莫能菌素促进外泌体的分泌，使外泌体的量增多。

Q28:如何保存纯化的细胞外囊泡？

添加EV-Save™ 细胞外囊泡封闭试剂 (产品编号:058-09261)，冷藏或冷冻保存。长期保存请置于-80℃。EV-Save™ 有冷冻保护作用，可使冻存的纯化细胞不受损伤。但是由于EV-Save™ 含有聚合物，不建议用于蛋白组学分析样品。

Q29:如何做回收外泌体提取液的Western blotting分析？

Wako实验室从回收的100 μL提取液中抽取15 μL，添加5 μL 4×SDS样品Buffer制备成20 μL的样品后，全部量使用于SDS-PAGE。宣传册上的Western blotting分析也是在同等条件下进行实验的。

■外泌体标记

Q30:如何确认用本试剂盒纯化的外泌体？

通过使用表面抗原的抗体的Western blotting、电镜分析、密度梯度离心、粒子径检测 (如NanoSight LM10) 等来确认。

Q31:外泌体纯化后用Western blotting法进行鉴定应使用哪些标记蛋白？

已知的有CD9, CD63, CD81, Tsg101, Alix, Flotillin-2, Lamp-1等。

■相关产品

Q32:可以提供可用于Western blotting的外泌体标记检测抗体吗？

Wako提供有应用实例的以下抗体：

抗原	反应	抗体	生产商	应用
CD63	人	抗CD63小鼠单抗 (3-13)	Wako, 产品编号: 012-27063	WB、ELISA、FCM、IP
CD81	人, 牛	抗CD81小鼠单抗 (17B1)	Wako, 产品编号: 011-27773	WB、ELISA、FCM、IP
CD9	人, 牛	抗CD9小鼠单抗 (1K)	Wako, 产品编号: 014-27763	WB、ELISA、FCM、IP

Q33:Wako可以提供从纯化的细胞外囊泡中提取RNA的试剂盒吗？

有的。使用microRNA Extractor® SP Kit (产品编号:295-71701) 比AGPC法更能高效地提取microRNA和mRNA。

Q34:Wako也可以提供磁力架吗？

有的。Wako也提供磁珠捕获用磁力架 (产品编号:290-35591)。

■实验条件

Q35:莫能菌素钠的使用条件是什么？

培养K562细胞时使用的莫能菌素钠的最终浓度为10 μmol/L。用乙醇溶解莫能菌素钠，配制10 mmol/L，按1/1000体积添加到培养基中使用。
参考文献：
"Exosome Release Is Regulated by a Calcium-dependent Mechanism in K562 Cells. *J Biol Chem.*, 2003 May 30, **278** (22), 20083-90."

Q36:阳性对照样品应该怎么准备？

培养HEK293等任意的对照细胞，准备所需要的细胞培养上清量，用Wako的试剂盒纯化外泌体。纯化的外泌体可以用Western blotting或ELISA分析以鉴定CD9、CD63、CD81等外泌体标记蛋白的表达情况。
另外，关于培养条件举一个Wako实验室里的案例，在血清培养基中培养一天后，更换为无血清培养基和已含去外泌体FBS的培养基，培养3天左右后收集细胞培养上清。

Q37:BCA Assay的操作步骤是什么？

请按照以下的操作，制备标准品的标准曲线。由于本试剂盒中分离纯化的外泌体的蛋白浓度非常低，建议无需稀释直接进行检测。
① 把250、125、62.5、31.25、15.625 μg/mL的**BSA标准溶液**、空白标准品分别以25 μL/孔添加至96孔板孔中；
② 把外泌体溶液和洗脱缓冲液 (空白) 以25 μL/孔添加至96孔板中；
③ 添加200 μL Protein Assay BCA Kit (产品编号:297-73101) 配套的试剂A和试剂B的混合液 (A:B=50:1) 至上述的①，②中；
④ 60℃ 孵育30 min；
⑤ 室温冷却孔板；
⑥ 在560 nm下检测吸光度。

■ 疑难

Q38: 实验不熟练的人员应该如何操作?

参照Q36准备阳性对照。另外, 也有培养基中的细胞外囊泡较少的可能性, 可以适当扩大培养量。

• PS Capture™ 外泌体流式试剂盒

■ 试剂盒规格、功能	P.36
■ 试剂盒的操作方法、组成	P.36
■ 样品用量	P.36

■ 试剂盒规格、功能

Q1: 本试剂盒中含有外泌体检测用的抗体吗?

本试剂盒中不含外泌体检测用的荧光标记抗体。荧光素结合抗CD63抗体(产品编号: 018-27641)和红色荧光色素结合抗CD63抗体(产品编号: 011-27751), 或者其他合适的荧光标记抗体需另行购买。

Q2: 可以使用荧光标记二抗进行检测吗?

可以, 分离外泌体后, 按照以下操作进行一抗反应、二抗反应和游离细胞计数法分析:

- ① 混合未标记的一抗和外泌体捕获磁珠在室温下静置1 h。在20 min, 40 min, 1 h的时候涡旋振荡约5秒, 搅拌磁珠;
- ② 用300 μ L WB (+Enhancer) 清洗2次;
- ③ 用WB (+Enhancer) 100倍稀释PE标记二抗 (Jackson Immuno Research Laboratories, 产品编号: 115-115-164), 添加②的磁珠;
- ④ 室温下静置1 h。期间在20 min, 40 min, 1 h的时候涡旋振荡约5秒, 并搅拌磁珠;
- ⑤ 用300 μ L WB (+Enhancer) 清洗3次;
- ⑥ 在300 μ L WB (+Enhancer) 中重悬磁珠;
- ⑦ 用流式细胞仪分析。

Q3: 本试剂盒可以检测人以外的生物种的外泌体吗?

可以。有人, 小鼠, 牛, 猴子的使用实例。

Q4: MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS (产品编号: 293-77601) 适用于流式细胞术吗?

MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS是纯化外泌体的试剂盒, 不是流式细胞术检测用的试剂盒。PS Capture™ 外泌体流式试剂盒的磁珠和Washing Buffer的成分是根据流式细胞术检测条件而优化的, 所以请使用PS Capture™ 外泌体流式试剂盒。

■ 试剂盒的操作方法、组成

Q5: 本试剂盒的操作时间需要多久?

样品预处理约1 h, 试剂盒所有的步骤总计需要约2 h+20 min。具体包括: ①与样品反应1 h; ②荧光标记抗体染色1 h; ③清洗约20 min。

• PS Capture™ 外泌体 ELISA 试剂盒 (抗小鼠 IgG POD) • PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)

■ 试剂盒规格、功能	P.36
■ 与传统法比较	P.36
■ 试剂盒的操作方法、组成	P.36

■ 试剂盒规格、功能

Q1: 一定要制备标准品吗? 制备标准品时, 是否必须使用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS?

定量检测时, 请制备作为标准品的细胞外囊泡。超速离心法和聚合物沉淀法等提取的细胞外囊泡也可作为标准品, 但还是推荐使用与检测原理相同的PS亲和法提取的细胞外囊泡作为标准品。(详细制备方法请参考MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS的使用说明书)。

Q39: 与其他方法回收的外泌体样品相比, 本试剂盒纯化的外泌体样品的总蛋白量偏少, 这是为什么呢?

由于其他方法回收的外泌体样品中, 存在许多杂质, 所以总蛋白量会变多。另一方面, 虽然本试剂盒纯化外泌体样品的总蛋白量少, 但是样品的纯度高, 所获得的外泌体量不比其他方法少。

■ 相关产品	P.36
■ 疑难	P.36

Q6: 多个外泌体捕获磁珠可能与一个外泌体结合, 造成磁珠聚集。这种情况下, 能准确进行测试吗?

建议根据前角和侧角散射光确定的单线态磁珠部分来调整设门参数, 然后检测外泌体捕获磁珠在所选区域内的荧光信号。一般单线态磁珠占总体样本的50%~70%。

Q7: 如何检测已纯化的外泌体样品?

将纯化完成的外泌体稀释成适当的浓度后, 按照使用说明书的2. 细胞外囊泡的分离进行实验。稀释纯化外泌体时, 请使用超纯净水10倍稀释的试剂盒配套的Washing Buffer (10 $\times$)。可检测出纯化外泌体的浓度范围为125~1000 ng/mL。检测抗体建议使用抗CD63单克隆抗体 (3-13), 红色荧光色素 (635) 结合 (产品编号: 011-27751)。

Q8: 用10种不同抗体检测时, 所需的样品和磁珠的量是多少?

请参考使用说明书的表2各反应数中试剂以及样品的使用量。表2中有说明10次反应量。用367 μ L的样品和110 μ L Exosome Capture Beads 反应并分离外泌体, 用WB (+Enhancer) 清洗后, 在1,100 μ L WB (+Enhancer) 中悬浮磁珠。然后, 根据3免疫染色分成100 μ L一小份的步骤进行后续实验。

■ 样品用量

Q9: 检测使用的样品的最低量是多少?

1个样品需要33 μ L左右。但是, 样品中所含的细胞外囊泡较少时, 请将已经过离心处理的细胞培养上清进行超滤浓缩后再上样。(推荐超滤管: Sartorius Vivaspinn20, 截留分子量100 K, 产品编号: VS2041)

■ 相关产品

Q10: 有销售磁力架吗?

有的。Wako也供应磁珠捕获用磁力架 (产品编号: 290-35591)。

■ 疑难

Q11: 磁力架上的磁珠不集磁。

本试剂盒的外泌体捕获磁珠针对流式细胞仪检测进行了优化, 磁珠浓度降低。因此, 有时用目测难以确认磁珠集磁。进行清洗操作前, 将样品管在磁力架上静置至少1 min, 小心缓慢地进行移液操作且避免枪头吸到磁珠。

■ 样品用量	P.36
■ 相关产品	P.36
■ 疑难	P.36

Q2: 为什么没有配套的标准品?

每种细胞分泌的细胞外囊泡的表面标记蛋白的种类和含量存在差异, 标准品和检测样品的来源细胞必须一致。因此本试剂盒未配套标准品, 请制备与样品相同来源细胞的细胞培养上清中提取的标准品。

Q3:血清、血浆样品可直接检测吗?

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (Streptavidin HRP) 可以直接检测。
但是PS Capture™ 外泌体 ELISA 试剂盒 (抗小鼠 IgG POD) 配套的检测二抗与人、小鼠、大鼠IgG发生非特异反应, 不适用于人、小鼠、大鼠的血清和血浆样品的直接检测。

Q4:细胞培养上清样品可直接测定吗?

无论哪个试剂盒都可以直接检测。由于PS Capture™ 外泌体 ELISA 试剂盒 (抗小鼠 IgG POD) 配套的一抗 (抗CD63抗体) 和二抗都不与牛IgG发生非特异性反应, 可直接检测无血清培养基和含FBS培养基的细胞培养上清。另外, PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP) 配套的生物素标记抗体 (抗CD63-生物素), 链霉亲和素HRP也相同。请用于细胞培养上清样品中的细胞外囊泡的定量分析和定性分析。

Q5:可以变更一抗吗?

可以。使用PS Capture™ 外泌体 ELISA 试剂盒 (抗小鼠 IgG POD) 时, 先选择想检测的表面标记小鼠抗体, 请根据使用说明书确定最佳浓度。
使用PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP) 时, 先选择任意的表面标记检测用生物素标记抗体, 请根据使用说明书确定最佳浓度。无法获取生物素标记抗体时, 可以使用Biotin Labeling Kit-SH (产品编号: 348-90941) 或Biotin Labeling Kit-NH2 (产品编号: 347-90891) 非标记抗体进行生物素标记。

Q6:残留的试剂应该如何保存?

请参考使用说明书的【6. 试剂盒拆分使用时, 各组成试剂的保存方法】。

Q7:哪些细胞是有纯化实例以及检测实例的细胞。

下表为Wako已测试过的细胞系

细胞株	来源	提取试剂盒	ELISA试剂盒
A549	人肺泡基底上皮腺癌	—	○
BxPC-3	人胰腺癌	—	○
COLO201	人结肠腺癌	○	○
COS7	非洲绿猴肾	○	○
FM3A	小鼠乳腺癌	○	○
HCT116	人结肠癌	○	○
HEK293	人胚胎肾	○	○
HEK293T	人胚胎肾	○	○
HeLa	人宫颈癌	○	○
HPAF II	人胰腺肿瘤	—	○
HuH-7	人肝癌	○	○
HUVEC	人脐静脉内皮细胞	○	○
iPS	诱导多能干细胞	○	○
K562	人慢性粒细胞白血病	○	○
LNCaP	人前列腺癌	○	○
P388D1	小鼠白血病	○	○
Panc-1	人胰腺癌	—	○
RAJI	人伯基特淋巴瘤·B淋巴细胞样	○	○
SH-SY5Y	人神经母细胞瘤	—	○
TIG-3	正常的二倍体成纤维细胞	○	○
THP-1	急性单核细胞白血病	○	○
U2OS	人骨肉瘤	○	○
BM-MSC	骨髓来源间充质干细胞	○	○
iCell-MSC	iPS来源间充质干细胞-01279	○	○

—:未实施 ○:有纯化和检测数据

Q8:本试剂盒可以检测细胞外囊泡的回收率吗?

可以, 请参考P25的与聚合物沉淀法比较回收率。

■与传统方法比较

Q9:检测灵敏度高吗?

已证实该试剂盒检测细胞外囊泡, 相比使用固相化抗体的ELISA方法或将纯化样品直接固定在平板上的灵敏度要更高。此外, 已经实验验证本试剂盒与Western blotting有相关性。

■试剂盒的操作方法、组成

Q10:本试剂盒的操作时间需要多久?

PS Capture™ 外泌体 ELISA 试剂盒 (抗小鼠 IgG POD) 的操作流程需要约5 h。具体包括:①将细胞外囊泡样品固定在孔板上需要2 h;②一抗的反应需要1 h;③二抗反应需要1 h;④TMB反应需要30 min。再加上其他清洗操作, 大约需要5 h才能完成检测。
PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP) 的操作流程需要约6 h。具体包括:①将细胞外囊泡样品固定在孔板上需要2 h;②一抗的反应需要1 h;③链霉亲和素HRP反应需要2 h;④TMB反应需要30 min。再加上其他清洗操作, 大约需要6 h才能完成检测。
添加终止液后, 检测450 nm和副波长620 nm (600~650 nm) 的吸光度。

Q11:外泌体捕获96孔板是可循环使用的吗?

终止液会使孔板上的蛋白变性, 因此不可循环利用。

Q12:实验操作中有可以留到第二天的步骤吗?

将各样品固定在孔板上并保存于4°C, 过夜反应也是没有问题的。

■样品量

Q13:检测使用的样品的最低量是多少?

有相当于1 ng左右细胞外囊泡的蛋白即可检测。从COLO201细胞培养上清中提取的细胞外囊泡检测界限为11 pg。细胞系不同检测界限也随之变化。

Q14:直接检测培养上清和体液样品时, 需要多少样品?

几微升 (1~5 μL) 左右的细胞培养上清和体液样品即可充分检测。建议用于检测培养基中的细胞外囊泡量随时间变化, 以及分析新型培养上清样品。但由于细胞类型 (iPS细胞等) 不同, 可能出现培养基中的细胞外囊泡量少的情况。不清楚样品中的细胞外囊泡量时, 推荐进行预实验确定合适的上样量。

■相关产品

Q15:有推荐使用的一抗吗?

以下抗体是Wako已验证可在该ELISA法中使用的抗体。

抗原	反应	抗体	生产商	应用
CD9	人, 牛	抗CD9小鼠单抗 (1K)	Wako, 产品编号: 014-27763	WB、ELISA、FCM、IP
CD63	人	抗CD63小鼠单抗 (3-13)	Wako, 产品编号: 012-27063	WB、ELISA、FCM、IP
CD81	人, 牛	抗CD81小鼠单抗 (17B1)	Wako, 产品编号011-27773	WB、ELISA、FCM、IP

■疑难

Q16:无法顺利检测结果, 应该如何处理?

请确认使用的各个试剂是否都还在有效期内。请务必添加Exosome Binding Enhancer (100×) 至Washing Buffer。若是无法确认试剂盒配套的Control Primary Antibody Anti CD63 (100×) 和Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 (100×) 的信号的情况下, 请考虑CD63的表达量是否在检测界限之下或其他原因, 也可咨询Wako在当地的经销商。

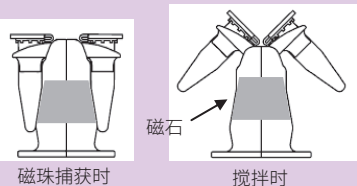
相关产品

■MagCapture™ 系列用磁珠捕获磁力架

本产品是用于捕获磁珠的磁力架。主要适用于MagCapture™ 系列产品以磁珠法分离细胞培养上清、血清、尿液等样品含有的特定成分。可同时进行16支1.5 mL (0.2 mL) 离心管的操作，磁力架嵌有强力磁石，可短时间内捕获微小的磁珠。

【特点】

- 可移动的弹起式离心管架固定部
弹起式装置可分离离心管及离心管架，通过涡旋振荡器对离心管内磁珠进行搅拌
- 弹起式装置装卸试管，可同时对16支离心管进行磁珠捕获
- 采用钕制磁石，直接接触离心管的构造，使捕获时间最小化
- 采用树脂材质，样品的可见性良好，实现了小型轻量化



产品图片

■规格及功能

- 尺寸：W198.8×D49×H49 (mm)
- 重量：235 g
- 操作容量：20 μ L~1,500 μ L (2,000 μ L)
- 磁珠捕获时间：1.0 μ m磁珠 1 mL：约25s
2.7 μ m磁珠 1 mL：约10s
4.5 μ m磁珠 1 mL：约2s

※捕获时间因溶液性质和容量而变。

产品编号	产品名称	包装
290-35591	Magnet Stand MagCapture™ 系列用磁珠捕获磁力架	1台

■UniWells™ 水平连接细胞共培养板

UniWells™ Horizontal Co-Culture Plate是两个孔的水平连接型新型共培养容器。传统的共培养板都是使用上下共用培养液的细胞培养板，培养条件无法上下不同并且很难同时观察上下层的细胞。本产品是水平连接，既能在相同条件下培养细胞，也可以同时观察细胞。



【特点】

可以使用延时显微镜同时观察

由于无需调整焦距，可以同时观察左右两个培养板中的细胞。只要使用适配托盘（配套），就适用于各类显微镜。

可以在相同条件下培养细胞

相同体积和相同底部材料。

可以使用任意的滤膜

可以插入滤膜，防止两个板间的细胞混合。

可以单独培养各种细胞

可以将分开培养的细胞自由组合拼接。

【试剂盒内容】



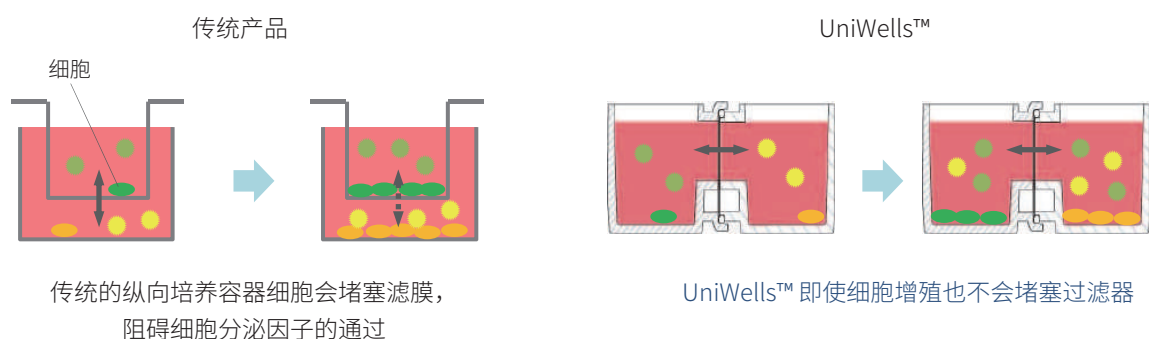
UniWells™ Horizontal Co-Culture Plate (1 set)
※滤膜另售

水平共培养的优点是什么？

1) 实验培养基量相同



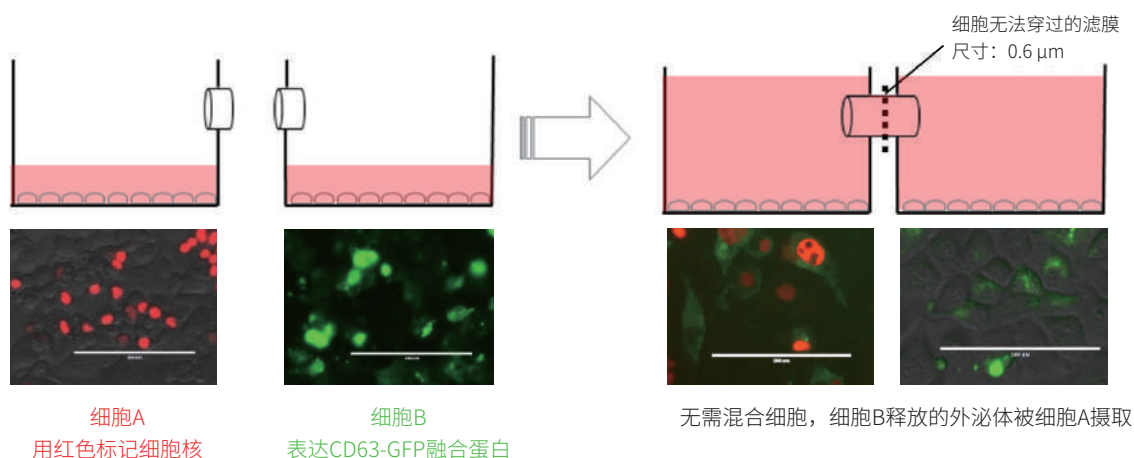
2) 细胞不会堵塞过滤器



应用实例

外泌体摄取

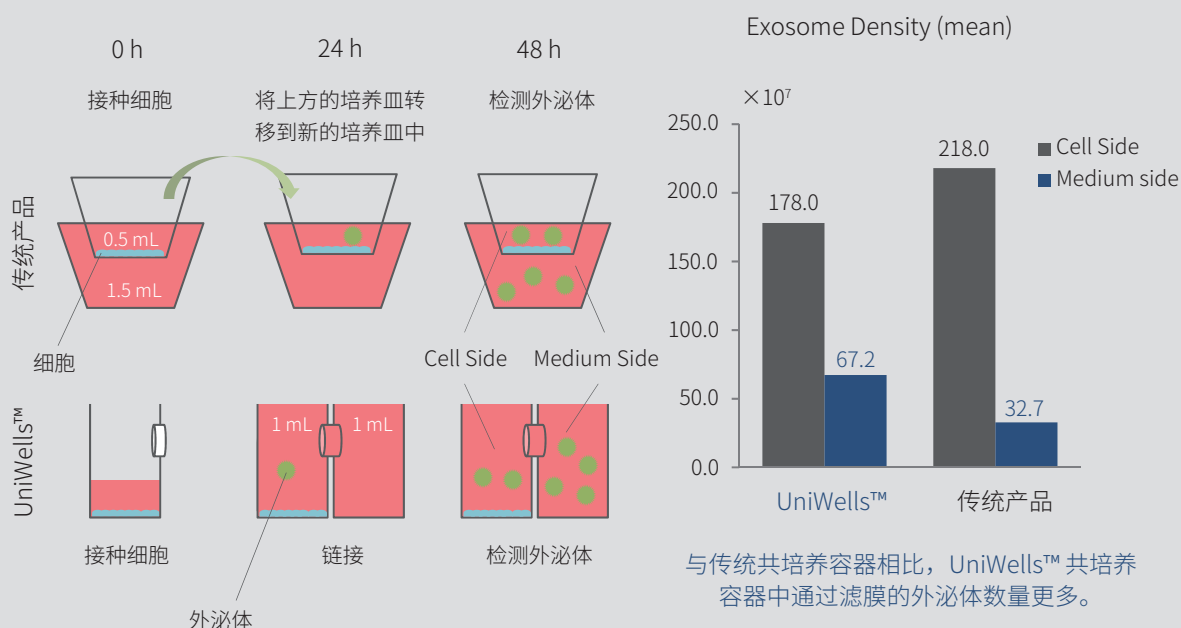
使用UniWells™ Horizontal Co-Culture Plate进行实验，检测细胞释放的外泌体扩散后，能否通过滤膜被另外的细胞摄取。



通过使用UniWells™ 无需混合细胞，并且可以只让外泌体通过滤膜。
通过使用UniWells™ 可以简易地检测外泌体是否被另一种的细胞摄取。

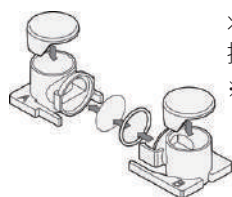
外泌体渗透率的比较

在传统共培养容器和UniWells™ 共培养容器的两边培养皿分别接种相同数量的细胞。细胞接种24 h后开始共培养。接种48 h后，用NanoSight分别检测两个共培养器中的外泌体。本实验的培养基量相同。



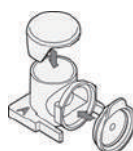
使用方法和规格

连接使用

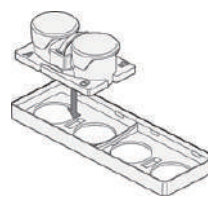


将滤膜、O型密封环、盖子接在一起。
※滤膜需另行购买

单独使用



将通用盖和盖子合上即可使用。

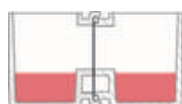


置于适配器中，就可以简单地在显微镜下观察细胞。

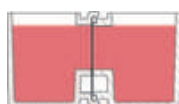
*接口在适配器底部。

连接方法有以下两种

- 将单独培养过的孔中的培养基引过去并连接
- 一开始连接后，增加培养基的量至共培养状态

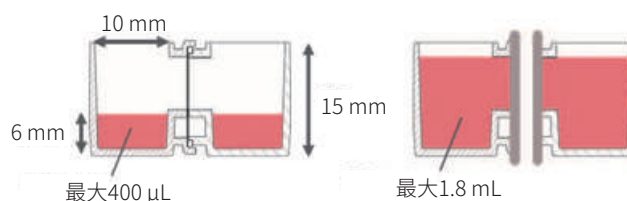


非共培养状态



共培养状态

孔的大小和容量



疑难解答

产品的材质是什么？

UniWells™ 主体的材质是聚苯乙烯，通用盖的材质是低密度聚苯乙烯。另外滤膜（另售）使用的是蛋白难以吸附的聚碳酸酯。

需要灭菌吗？

包装后进行了电子束灭菌所以不需要灭菌。由于聚苯乙烯和低密度聚苯乙烯的耐热温度低，所以不能高压灭菌。原则上本产品不可回收利用。

有涂层吗？

UniWells™ 没有涂层，请根据需求对培养皿进行包被。

接种的细胞数有标准吗？

Ginrei Lab向每个孔中添加190 μL制备成 5×10^4 个/mL的NHDF（人成纤维细胞）和PANC-1（人胰腺癌培养细胞）。24 h细胞贴壁后，约40%~50%的细胞进行了汇合。但是适当的细胞数根据实验和细胞的种类会有很大的差异，需要根据条件进行讨论。

可以用什么样的显微镜进行观察？

UniWells™ 和载玻片尺寸相同，可用各种显微镜观察。CQ1（横河电机株式会社），JuLI™ Stage（Air Brown）的显微镜制造商也已经确认可以使用。

产品列表

水平连接细胞共培养板

产品编号	产品名称	用途	包装
384-14421	UniWells™ Horizontal Co-Culture Plate UniWells™ 水平共培养板	培养容器（材质：聚苯乙烯）	10 set
381-14431	UniWells™ Filter 0.03 μm UniWells™ 滤膜0.03 μm	专用滤膜（孔径0.03 μm）	50片
388-14441	UniWells™ Filter 0.6 μm UniWells™ 滤膜0.6 μm	专用滤膜（孔径0.6 μm）	50片
385-14451	UniWells™ Adapter 96 UniWells™ 共培养板适配器96	96孔板尺寸支架	1个

外泌体RNA抽提试剂盒

产品编号	产品名称	包装
295-71701	microRNA Extractor® SP Kit microRNA提取试剂盒	50次用

蛋白定量检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
297-73101	Protein Assay BCA Kit 蛋白测定试剂盒（二喹啉甲酸）	250次用

高纯度外泌体提取试剂盒 — 无需超离 —

产品编号	产品名称	包装
299-77603	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS	2次用
293-77601	MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS	10次用

— 高灵敏度检测 — 外泌体ELISA试剂盒

产品编号	产品名称	包装
297-79201	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD) PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒（抗小鼠IgG POD）	96次用
298-80601	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP) PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒（链霉亲和素HRP）	96次用

产品列表

流式细胞仪用高灵敏性定性分析试剂

产品编号	产品名称	包装
297-79701	PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit PS Capture™ 外泌体流式试剂盒	300次用

防止吸附剂

产品编号	产品名称	包装
058-09261	EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent EV-Save™ 细胞外囊泡吸附抑制剂	1 mL

高灵敏度检测抗体系列

产品编号	产品名称	包装
016-27061	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13)	20 µL
012-27063	抗CD63单抗 (3-13)	100 µL
018-27641	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Fluorescein Conjugated	25次用
014-27643	抗CD63, 单克隆抗体 (3-13) , 荧光素结合	100次用
013-27711	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Biotin Conjugated	25次用
019-27713	抗CD63单克隆抗体 (3-13) , 生物素结合	100次用
011-27751	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Red Fluorochrome(635) Conjugated	20 µL
017-27753	抗CD63单克隆抗体 (3-13) , 红色荧光染料 (635) 结合	100 µL
018-27761	Anti CD9, Monoclonal Antibody (1K)	20 µL
014-27763	抗CD9单克隆抗体 (1K)	100 µL
015-27771	Anti CD81, Monoclonal Antibody (17B1)	20 µL
011-27773	抗CD81单克隆抗体 (17B1)	100 µL

磁珠捕获用磁力架

产品编号	产品名称	包装
290-35591	Magnet Stand MagCapture™ 系列磁珠捕获用磁力架	1个

上述试剂仅供实验研究用,不可用作“医药品”、“食品”、“临床诊断”等。

Listed products are intended for laboratory research use only, and not to be used for drug, food or human use. / Please visit our online catalog to search for other products from FUJIFILM Wako; <https://labchem-wako.fujifilm.com> / This leaflet may contain products that cannot be exported to your country due to regulations. / Bulk quote requests for some products are welcomed. Please contact us.

富士胶片和光(广州)贸易有限公司

广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼
3002-3003室

北京 Tel: 13611333218

上海 Tel: 021 62884751

广州 Tel: 020 87326381

香港 Tel: 852 27999019

询价: wkgz.info@fujifilm.com

官网: labchem.fujifilm-wako.com.cn

官方微信



目录价查询

