

Exosome

Research Products Ver. 3

目录

综述

3

“何谓外泌体?” 金泽大学 纳米生命科学研究所 华山力成 教授	3
---------------------------------	---

关于PS亲和法

5

前言	5
磷脂酰丝氨酸和Tim4新型外泌体提取法	5
外泌体分离和纯化方法的比较	5
PS亲和法的性能数据	6
【专栏】不能仅凭蛋白总量计算外泌体回收量的原因	9
金泽大学 纳米生命科学研究所 华山教授问答集《关于PS亲和法的优点与常见问题》	9

外泌体分离和纯化

11

MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver.2	11
------------------------------	----

miRNA提取和纯化

13

纯化细胞外囊泡 (EV) 用miRNA提取试剂盒	13
--------------------------	----

外泌体检测和定量

14

使用PS亲和法开发ELISA试剂盒	14
外泌体ELISA试剂盒选择表	14
PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD)	15
PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)	16
CD9/63/81-Capture人外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)	18
PS Capture™ 外泌体流式试剂盒	20
抗外泌体标记物抗体 (CD9/CD63/CD81)	22

外泌体的吸附抑制和冷冻保存剂

24

EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂	24
EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂 (动物体内实验用)	25

纯化外泌体

26

COLO201细胞来源纯化物外泌体	26
-------------------	----

培养基和培养器具

27

MSCulture™ High Growth基础培养基 / MSCulture™ High Growth添加剂	27
EV-Up™ 间充质干细胞外泌体生产用基础培养基, AF / EV-Up™ 间充质干细胞外泌体生产用添加剂, AF	28
UniWells™ 水平连接细胞共培养板	30

常见问题

32

近年来,细胞外囊泡(EV)研究正加速发展。2011年约有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30~100 nm),存在于大多数体液(如血液、尿液、脑液等)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(例如ESCRTs等)和细胞内运输相关蛋白(例如Rab GTPase等)、以及细胞膜来源蛋白(例如CD63、CD81等)等为代表的各种分泌细胞来源的蛋白和RNA,同时还含分泌细胞的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备受瞩目。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⁴⁾,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,自从在外泌体内发现分泌细胞来源的mRNA和miRNA后,外泌体参与细胞间基因表达信息的水平转移的可能性备受瞩目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除了被翻译为蛋白质,还通过miRNA抑制靶基因的翻译,使得外泌体在靶细胞内调控基因表达。一个外泌体所含的蛋白质有数万种,mRNA、miRNA的种类有数千种以上,这些分子的组成因来源细胞的不同而异,也会根据细胞的状态而变化。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,可能会引发该细胞内的功能性蛋白的表达,但外泌体中大部分的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EVplugin已成为一种通用的分析手段。今后,在推进外泌体研究方面,各个研究领域的信息共享至关重要。

运用外泌体研发治疗方法和诊断方法

近年来,随着外泌体的功能逐渐阐明,越来越多的研究着眼于开发运用外泌体功能的治疗方法。例如,血液中的成纤维细胞(间充质祖细胞的一种)所释放的外泌体,可以通过促进角质细胞的迁移、增殖和血管新生来促进伤口愈合。报告指出,外泌体内的促血管生成miRNA、抗炎性miRNA和促胶原蛋白沉淀miRNA等参与了上述过程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,聚集了高浓度诱导细胞死亡的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。随着研究的不断发展,还会扩大外泌体的功能阐明和临床应用的适应性,有望将外泌体应用于各种疾病的治疗。此外,还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往哪一种细胞,该特性有望用于开发新型DDS¹⁵⁾。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,与健康细胞来源外泌体和组成分子的差异性备受瞩目,并作为癌症早期的诊断工具,被研究其与癌症发展的相关性¹⁶⁾。此外,尿液中的外泌体有望作为肾脏、前列腺疾病和膀胱疾病的新型诊断标记,脑脊液中的外泌体作为脑部肿瘤和神经退行性疾病的新颖标记。

外泌体研究的课题和展望

尽管目前已有许多关于外泌体作用的报导,但是在这些验证实验中使用了从体液和培养细胞上清中纯化的高浓缩外泌体,所以可能无法反映它们在活体内的真实性状。因此,目前尚未阐明该现象是否在活体内真实发生了。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现象,这也是进一步研究发展的方

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重要的研究课题。

截止目前为止,外泌体纯化的方法主要有超速离心法和PEG沉淀法,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是由外泌体组成成分所引起的。并且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,因此外泌体的研究相对困难,需要尽快开发可简单纯化高纯度外泌体的技术。因此FUJIFILM 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⁾。由于Tim4以钙离子依赖性方式与外泌体膜表面的磷脂酰丝氨酸(PS)结合,因此用含有螯合剂乙二胺四乙酸(EDTA)的洗脱缓冲液可将结合的外泌体释放出来,从而获得高纯度的完整外泌体。实际上,用Tim4亲和法纯化的人白血病细胞释放的外泌体,其纯度与超离法和PEG沉淀法纯化的外泌体相比,可检测出10~100倍以上的外泌体特异性蛋白,并且几乎没有外泌体以外的杂质,由此证明通过该方法可以重复性良好地纯化高纯度外泌体。因此,该方法可以检测大量目前为止无法检测的外泌体上的蛋白和RNA。利用Tim4对外泌体的强结合能力,可用ELISA或FACS高灵敏度检测和定量外泌体。此外,以往只能用差速离心法粗略纯化的微囊泡,通过运用Tim4亲和法,可实现高纯度纯化微囊泡。本指导书中对这些技术进行了详细说明,我们期待这项技术的有效性受到世界各方好评,并有望贡献于外泌体和微囊泡的生理功能的分析研究。

外泌体的检测和分离的难点,以及外泌体的分类方法多样,导致研究人员尚未统一定义以何种方法纯化的细胞外囊泡可以称为“外泌体”,如何进行实验数据的解释和再现性的确认是一项难题。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)}。另外为了规避上述的混乱情况,还建立了记录各论文实验条件的EV-TRACK knowledge database²⁰⁾。一方面随着EV研究倍受瞩目,各国也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也于2016成立小组会。受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项目也包含了EV研究。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,期待会加速研究发展。无论如何,未来EV研究的发展,需开发可成为其研究基础的稳定的研究方法和技术,期望Tim4亲和法可成为其中之一。

参考文献

- 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-Rudzi 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, Gabrielsson 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.

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。因此,下文将介绍可解决上述这些外泌体实验技术相关课题的,由FUJIFILM Wako全新开发的新型外泌体分析工具。

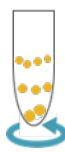
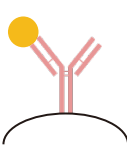
磷脂酰丝氨酸和Tim4新型外泌体提取法

外泌体膜虽然含有分泌细胞来源蛋白质和脂质,但目前普遍认为在活细胞中磷脂酰丝氨酸(PS)通过脂质翻转酶的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



以上述知识作为参考,我们利用Tim4固化磁珠,在钙离子存在下捕获培养上清和血清等样品中的外泌体,然后通过添加螯合剂即可纯化外泌体,这种划时代的外泌体纯化方法是由FUJIFILM Wako和金泽大学纳米生命科学研究所的华山教授共同开发并取得了成功⁵⁾。PS亲和法与传统的外泌体纯化法相比,可实现更加简单地纯化完整状态的高纯度外泌体。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。

外泌体分离和纯化方法的比较

	超速离心法	密度梯度离心法	聚合物沉淀法	抗体亲和法	PS亲和法
方法	 通过100,000×g超速离心使外泌体沉淀	 添加蔗糖后进行离心,根据沉降速度进行划分	 通过PEG等聚合物使外泌体沉淀	 使用针对外泌体表面抗原的抗体捕获外泌体	 通过与外泌体表面PS结合的Tim4捕获外泌体
纯度	++	+++	+	+++	++++
回收量	++	+	++ (总蛋白量较多)	++	+++ (总蛋白量较少)
完整度	○	○	○	×	○

※本表格根据FUJIFILM Wako自行调查的结果制成。表中结果可能因样品、检测对象与方法的不同而有所差异,无法保证以上各方法的性能。

参考文献

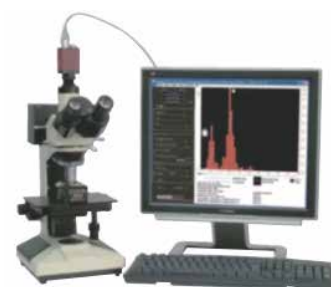
- 1) Tkach, M. et al. : *Cell*, **164**, 1226(2016).
- 2) Raimondo, F. et al. : *Proteomics*, **11**, 709(2011).
- 3) Trajkovic, K. et al. : *Science*, **319**(5867), 1244(2008).
- 4) Miyanishi, M. et al. : *Nature*, **450** (7168), 435(2007).
- 5) Nakai, W., et al. : *Sci. rep.*, **6** (1), 1(2016).

PS亲和法的性能数据

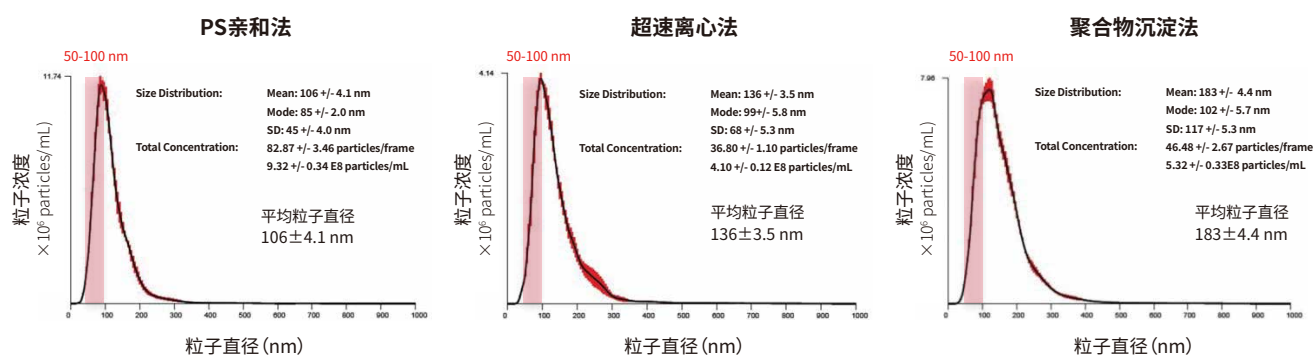
▼ 使用NanoSight分析粒子

NanoSight是通过NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) 将溶剂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。即使溶剂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观察视频, 然后检测不同粒径的粒子数量。

将利用PS亲和法、超速离心法、聚合物沉淀法从细胞培养上清中获取的外泌体分别用超纯水稀释至适当浓度, 再使用 NanoSight LM10分析粒子直径和粒子浓度。



NanoSight M10



Nakai, W. et al.: Sci. Rep., 6(1), 1(2016).

结果 PS亲和法所提取的检测粒子中, 检测到与外泌体粒径 (50~100 nm) 相当的粒子浓度更高, 纯度更高。

▼ 使用电子显微镜分析粒子

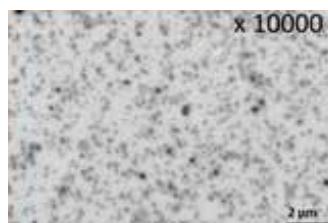
电子显微镜可以通过利用电子束获取检测对象的放大图像。电子束被视作电磁波时, 由于其波长非常短, 与光学显微镜相比可进行更高倍率的形态观察, 因此被应用于所有样品的观察和分析, 例如金属和高分子材料, 以及活体组织、植物、食品等含水物质。本次使用透射电子显微镜 (TEM) 对外泌体进行了分析。

PS亲和法

样品: COLO201细胞培养上清10 mL

粒子数: 3.69×10^{10} particles/mL

PS亲和法

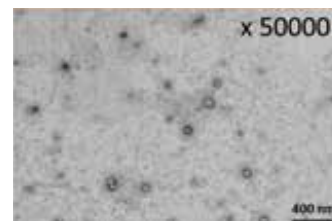
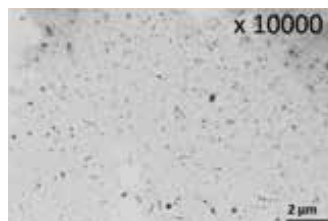


超离法回收样品

样品: COLO201细胞培养上清10 mL

粒子数: 1.68×10^{10} particles/mL

超速离心法



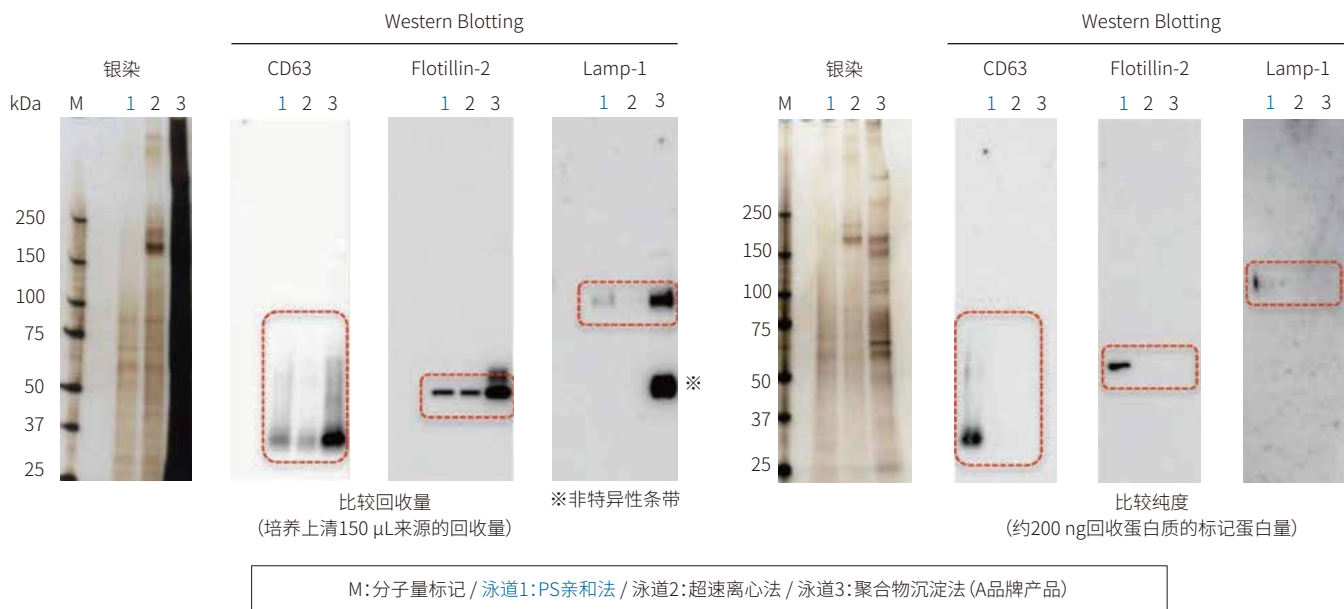
<照片数据提供> 花市电子显微技术研究所

结果 PS亲和法可分离粒子数更多, 纯度更高的外泌体。

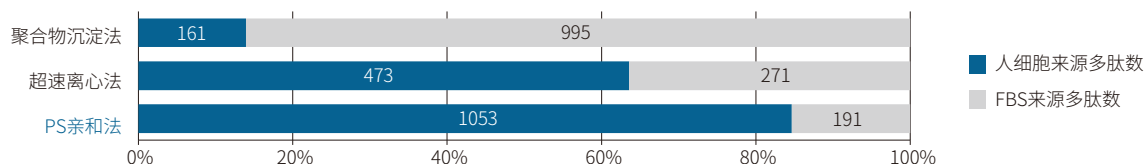
▼ 通过Western blotting比较回收量和纯度

使用PS亲和法、超速离心法和聚合物沉淀法从K562细胞培养上清中(添加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。

另外使用MS分析各回收组分, 并比较所有已检测的多肽中K562细胞来源的人源多肽的比例。



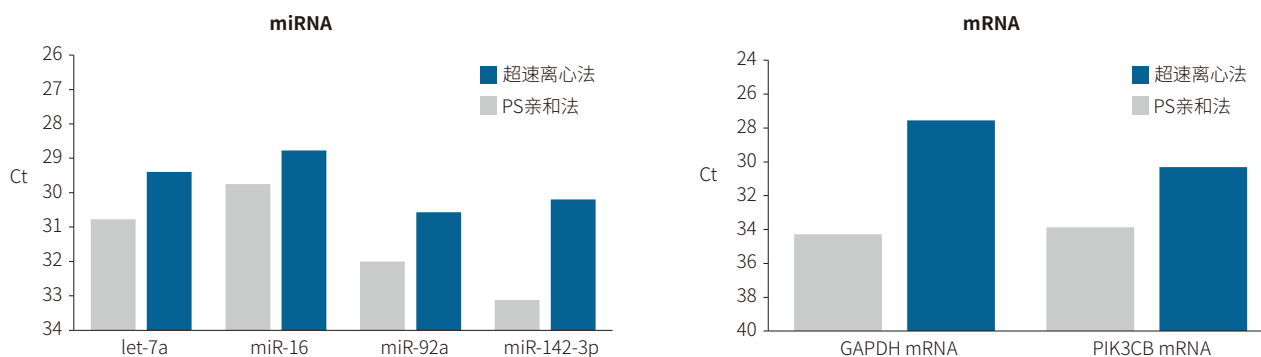
【参考】通过MS分析鉴定的人源肽的比较:



结果 PS亲和法可从FBS添加培养基中回收高纯度的外泌体。

▼ 比较microRNA和mRNA的回收量

通过超离法和PS亲和法从健康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) 回收RNA。通过定量PCR法检测microRNA量 (let-7a, miR-16, miR-92a, miR-142-3p) 和mRNA量 (GAPDH, PIK3CB), 并比较Ct值。



结果 与超速离心法相比, PS亲和法回收的外泌体能更有效地回收microRNA和mRNA。

▼ 蛋白质组学分析

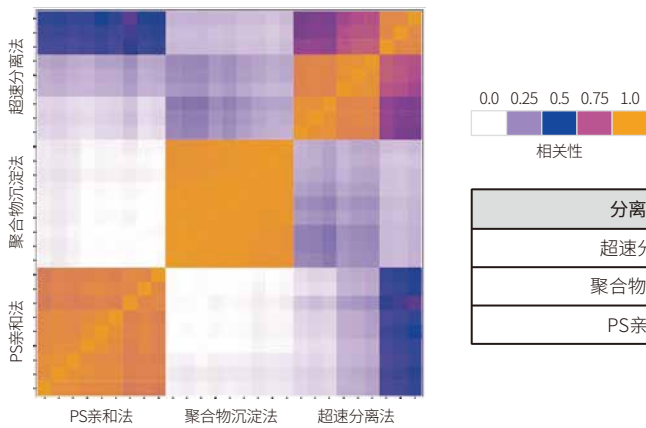
分别使用PS亲和法、超离法和聚合物沉淀法，从K562细胞培养上清（添加10%去外泌体FBS的培养基）中纯化外泌体。纯化的样品通过10% SDS-PAGE电泳分离，切下全部蛋白条带。然后进行胶内消化，用液相色谱质谱（LC-MS）鉴定蛋白。比较上述三种方法纯化的外泌体（n=3）中检测蛋白的成对相关性。

① 鉴定的蛋白含量前10的蛋白

	外泌体标记蛋白	外泌体来源人蛋白	牛血清来源牛蛋白
	PS亲和法	超速离心法	聚合物沉淀法
1	71 kDa热休克同源蛋白 (Heat shock cognate 71 kDa 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)	α2-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β5 (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)	β4微管蛋白 (Tubulin beta-4B chain)	β5微管蛋白 (Tubulin beta-5 chain)

结果 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。

② 成对相关性比较



Nakai, W. et al.: Sci. Rep., 6(1), 1(2016).

结果 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。

【专栏】不能仅凭蛋白总量计算外泌体回收量的原因

在比较外泌体等细胞外囊泡 (EV) 的回收量时, 经常会检测回收物中的蛋白总量。但从血液中纯化的EV会混入白蛋白和脂蛋白等杂质, 如使用蛋白总量进行比较, 这类杂质越多便会导致EV的回收量的数值越高。而从细胞培养上清中回收的EV也有可能混入培养基中的白蛋白或血清来源蛋白等。

FUJIFILM Wako使用细胞培养上清液进行了验证, 虽然超速离心法纯化获得的蛋白总量更多 (表1), 但无论是粒子数还是四跨膜蛋白 (CD9/ CD63/CD81) ELISA都表明PS亲和法 (PS) 相较于超速离心法 (UC) 回收了更多的EV (表2, 图1)。这一结果表明, 蛋白总量并不能反映EV量, 无法准确评估外泌体等EV的回收量。

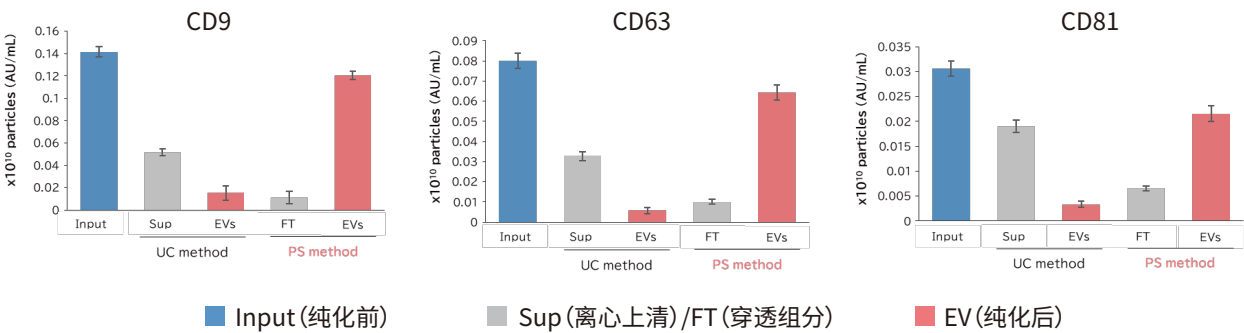
表1 通过BCA法比较总蛋白量

指标	PS亲和法	超速离心法
总蛋白量 (BCA法)	11.8 µg/mL	30.5 µg/mL

表2 通过Nanoparticle Tracking Analysis比较粒子数

指标	PS亲和法	超速离心法
粒子数	0.21×10 ¹⁰ particles/mL	0.09×10 ¹⁰ particles/mL

图1 通过四跨膜蛋白ELISA比较EV回收量



金泽大学 纳米生命科学研究所 华山教授问答集《关于PS亲和法的优点与常见问题》

作为外泌体等细胞外囊泡 (EV) 的分析利器, FUJIFILM Wako商品化使用PS亲和法的高纯度纯化法和高灵敏度定量法的时间已有7年。在此期间, 收获了来自日本国内外诸多研究者的好评, 我们很高兴能为EV的研究发展作出贡献。借此机会, 想要说明一下使用PS亲和法分析EV的优点以及一些常见问题。

PS亲和法是使用EV受体之一的Tim4来捕获EV的方法 (Sci Rep. 2016; 6: 33935)。EV原本是作为清除体内无用分子的机制进化而来, 在静脉给药时, 它会被肝脏和脾脏内的巨噬细胞捕

获并去除。在这些巨噬细胞表达的Tim4, 通过与暴露在EV膜表面的磷脂酰丝氨酸 (PS) 结合起作用。由此看出, PS亲和法与其他基于物理特性的分析技术不同, 是一项基于EV生理机制的分析技术。一般而言, 利用EV表面分子亲和力的EV分析方法具有高纯度和高特异性的优点, 但由于EV具有丰富的异质性, 因此经典的EV标记物——四跨膜蛋白 (CD9/CD63/CD81等) 的表达类型也会根据分泌细胞和位点的不同而产生差异。然而, 与其他亲和分析法相比, PS亲和法可以不受异质性的影响, 准确地捕获几乎所有类型的EV。

作为首个使用PS亲和法的分析工具，我们研发了EV用高纯度纯化法MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS。该工具的特点是使用Tim4固定化磁珠高效捕获EV，并使用Ca²⁺螯合剂EDTA处理后进行洗脱，可简单并且完整地回收EV。与超速离心法相比，该方法可高纯度纯化EV，还能识别过去无法识别的EV表面分子。此外与使用昂贵且需要熟练技巧的超速离心机相比，该方法可处理大量样品，并且再现性良好。随后PS Capture™ Exosome ELISA Kit作为EV用高灵敏度定量法问世。与使用传统四跨膜蛋白抗体捕获EV的ELISA相比，该分析工具检测EV的灵敏度高于100倍。这可能是因为Tim4与EV膜的结合比抗体与EV表面分子的结合更牢固、更稳定。

需要特别强调的PS亲和法的优点是，这些EV纯化法和定量法均基于相同的原理。目前，尝试使用EV作为疾病新型生物标记物的研究在全世界盛行，但频繁出现使用超速离心法鉴定的EV生物标记物无法通过ELISA法等被成功检出。而PS亲和法是使用Tim4在同一原理下纯化和定量EV，因此能够无缝分析EV生物标记物的鉴定和检测。

此外，通过流式细胞仪对EV的单颗粒进行分析的方法也有望成为未来EV的分析方法。目前已有多家公司正在开发和商业化专用于EV单颗粒分析的高灵敏度流式细胞仪，并已逐渐达到实际应用水平。使用PS亲和法的PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit能够通过Tim4磁珠捕获大部分（整个）EV，并使用普通的流式细胞仪定量EV表面的信号总和。捕获的大部分EV经EDTA处理，可轻松地从Tim4磁珠上洗脱，因此配合高灵敏度的流式细胞仪即可进行单颗粒分析。特别是在使用流式细胞术的EV单颗粒分析法中，使用荧光抗体等对EV进行染色后的清洗步骤非常重要。使用本方法能够轻松地从Tim4磁珠上彻底去除EV，因此可在短时间内回收特异性染色后的完整EV并进行分析。

接下来，将解答PS亲和法相关的常见问题。其中，最常见的问题就是有多少百分比的EV表达PS，其能否通过PS亲和法进行捕获。关于该问题，使用NTA法和ELISA法比较PS亲和法纯化前后样品中的EV数量，结果显示无论是使用何种细胞和体液样品中都能回收约90%的EV。另一方面，PS亲和法纯化的EV与超速离心法纯化的EV相比，生物活性更高，这可能是由于其功能性EV亚群浓缩更甚。造成这种差异的原因是什么呢？

因此，为了探讨各种EV纯化法纯化的EV亚群之间的差异，分别进行阴离子交换层析并比较其组成。如图1所示，按照盐度梯度可以划分为3个亚群（非阴离子、低阴离子和高阴离子），EV标记物等的分析结果显示，非阴离子EV中含有非典型EV，低阴离子EV中主要含有外泌体，高阴离子EV中主要含有微囊泡（*J Extracell Vesicles*. 2022; 11: e12205）。与超速离心法和尺寸排阻

法相比，使用PS亲和法纯化获得的EV中低阴离子EV的比例更高、高阴离子EV的比例更低。这可能是因为PS亲和法中Tim4与高阴离子EV的结合非常稳固，无法通过EDTA处理进行洗脱，最终导致结合相对较弱的低阴离子EV（主要为外泌体）被浓缩。

另外，使用血液探寻EV生物标记物的研究者们也提出了血浆样品能否使用PS亲和法的疑问。由于PS亲和法是依赖Ca²⁺捕获EV的方法，我们过去建议使用血清样品，而不是经Ca²⁺螯合剂处理的血浆样品。然而随后的研究证明，只需向血浆样品中添加Ca²⁺即可使用PS亲和法。但是添加Ca²⁺会促使血液凝固，因此需要同时添加肝素来避免凝血（具体方法请参考各产品的说明书）。

综上所述，PS亲和法具有许多优点，是能够作为EV的高纯度纯化法和高灵敏度定量法放心推荐的方法。另一方面，被视作EV纯化法黄金标准的超速离心法的拥趸者也不在少数，然而眼下无论哪一种EV纯化法都无法解决EV亚群分布不均的问题。目前EV研究的分析法多样，每种方法都有其优缺点，建议根据目的和用途选择合适的方法。但在对外发表研究结果时，必须清晰地标注使用了何种分析方法。此外，也可以把使用PS亲和法分析的EV记录为PS+EV。关键是再现性，若使用PS+EV可以确认强生物活性或疾病特异性生物标记物具有高再现性，那么这毫无疑问是一个优秀的研究成果。

最近有报告称，PS亲和法不仅能作用于EV，还能作为包膜病毒的分析工具发挥作用（*Nature*. 2022; 607: 345）。此外，第三方企业如ONI公司的Nanoimager EV Profiler Kit等也已经开始采用PS亲和法，预计其应用范围将进一步扩大。为了实现EV的药物研发，开发能够稳定且大规模纯化高纯度EV的技术是不可或缺的。除此之外，目前也在不断开发应用PS亲和法以实现纯化高生物活性EV的技术。希望今后PS亲和法能为EV研究的发展做出贡献。

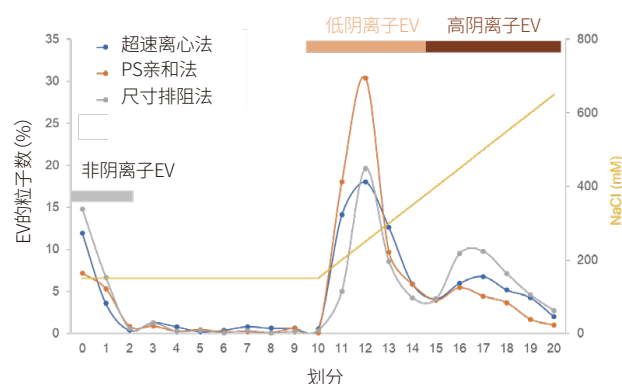


图1 各种EV纯化法纯化的EV亚群比较

可提高外泌体回收率和纯化纯度的外泌体分离和纯化试剂盒

MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver.2

MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver.2可以从细胞培养上清、血清、血浆等样品中高纯度且简便快捷地纯化外泌体等细胞外囊泡。通过应用以钙离子依赖方式与细胞外囊泡表面的磷脂酰丝氨酸(PS)结合的Tim4, 并使用整合剂实现完整的细胞外囊泡纯化。

■ 特点

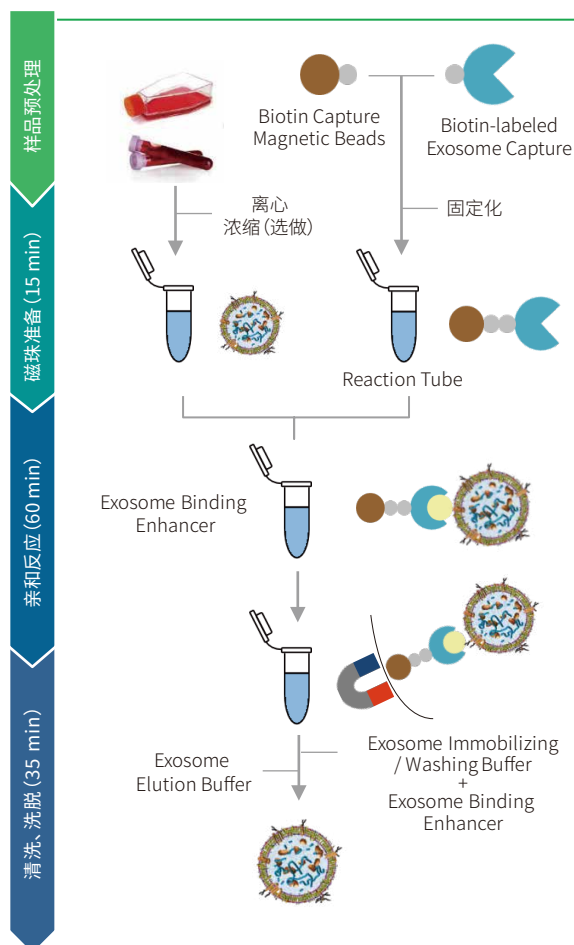
- 通过新型亲和法 (PS亲和法) 可获得高纯度的细胞外囊泡
- 与传统的超速离心法相比, 可获得更高回收量和纯度的外泌体
- 可获得完整的外泌体, 应用广泛
- 磁珠操作简便, 可处理多个样品
- 与Ver.1试剂盒相比, 提高了外泌体的回收率和纯度。降低了纯化外泌体的细胞毒性, 可直接添加到细胞中。

■ 试剂盒组成

试剂盒组成	2 tests	10 tests
Biotin Capture Magnetic Beads	120 μ L	600 μ L
Biotin-labeled Exosome Capture	20 μ L	100 μ L
Exosome Immobilizing / Washing Buffer (10 $\times$)	5 mL	25 mL
Exosome Binding Enhancer (500 $\times$)	300 μ L	1500 μ L
Exosome Elution Buffer (10 $\times$)	300 μ L	1500 μ L
Reaction Tubes	4支	22支

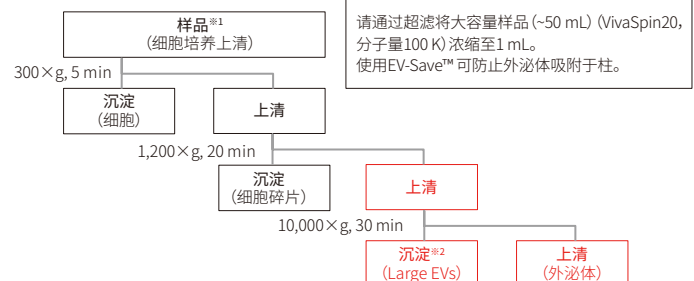


■ 实验流程

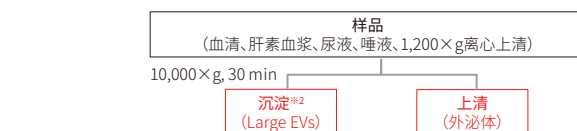


样品预处理流程

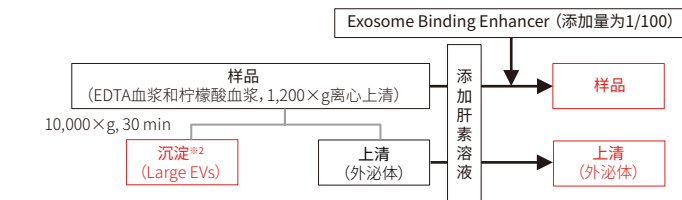
▼ 细胞培养上清



▼ 血清、肝素血浆、尿液、唾液



▼ EDTA血浆、柠檬酸血浆



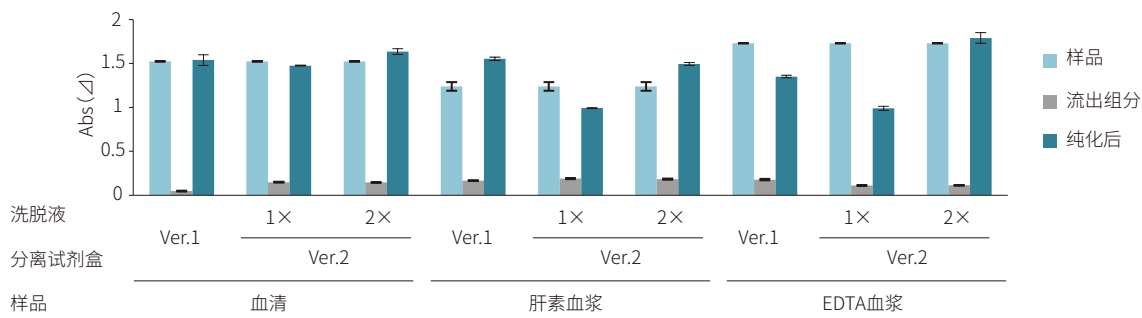
※2 获得Large EVs
通过离心分离 (10,000 $\times$ g, 30 min) 获得的沉淀经TBS悬浮后, 可作为样品使用。

应用数据

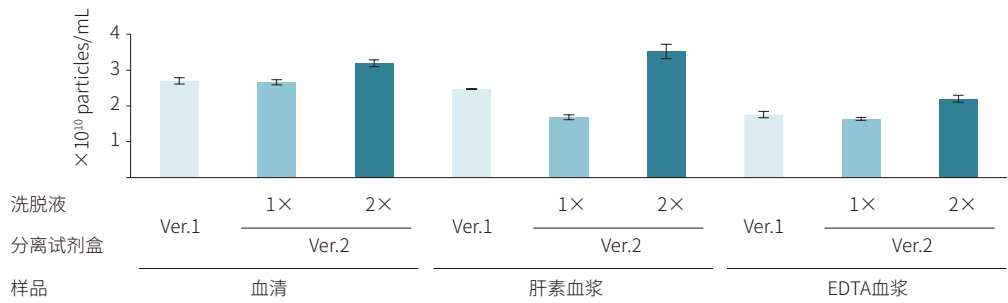
▼ 比较外泌体的回收率(血清、血浆)

分别使用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver.2 (以下简称为Ver.2)和MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS (以下简称为Ver.1) 分离和纯化人血液样品中的外泌体。并使用 Ver. 2测试了两种浓度(1×和2×)的洗脱液。

① ELISA (PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒)



② NTA

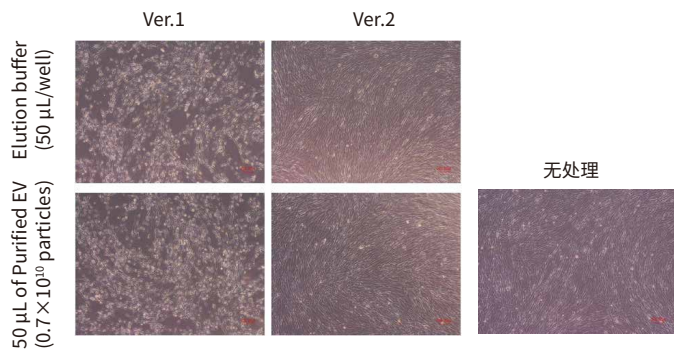


结果 与Ver.1相比, Ver.2的性能更优异。另外, 使用2×Elution buffer能够改善血浆样品的回收效率。

▼ 比较纯化外泌体的细胞毒性

使用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver.2和Ver.1分离和纯化COLO201细胞培养上清中的外泌体。然后仅将Elution Buffer或纯化外泌体添加至预先接种的人正常成纤维细胞中, 检测经过48 h后的细胞形态变化。

结果 使用Ver.1的样品在仅添加Elution Buffer或纯化外泌体48 h后出现了细胞死亡, 而使用Ver.2的样品并没有观察到明显的细胞毒性。



产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
294-84101	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2	基因研究用	2次用
290-84103	MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver.2		10次用

相关产品

产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
299-36421	MAGNET STAND MagCapture™ 系列磁珠捕获用磁力架	-	96 tests

纯化细胞外囊泡专用RNA提取试剂盒

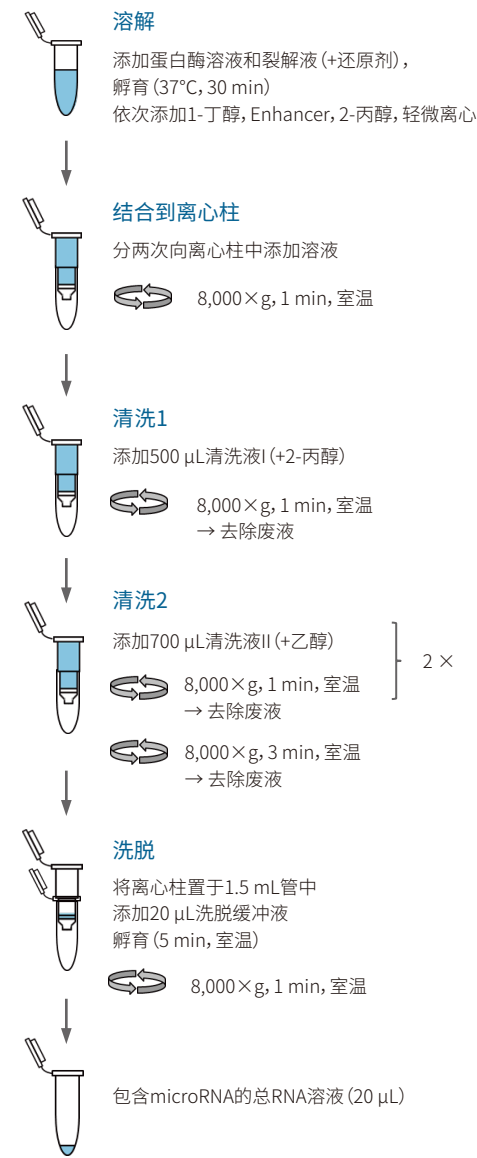
纯化细胞外囊泡 (EV) 用microRNA Extractor® Kit

纯化细胞外囊泡 (EV) 用microRNA Extractor® 试剂盒可以使用离心柱从外泌体等细胞外囊泡 (Extracellular Vesicle: EV) 中提取包含 microRNA 在内的总 RNA。只需少量洗脱液 (20 μL) 即可回收高浓度的 RNA，因此适用于二代高通量测序 (Next Generation Sequencing, 简称NGS)。

特点

- 只需少量洗脱液 (20 μL) 即可回收高浓度的 RNA
- 经优化，更适合从纯化 EVs 中提取 RNA
- RNA 回收量高于其他品牌的常规产品

实验流程



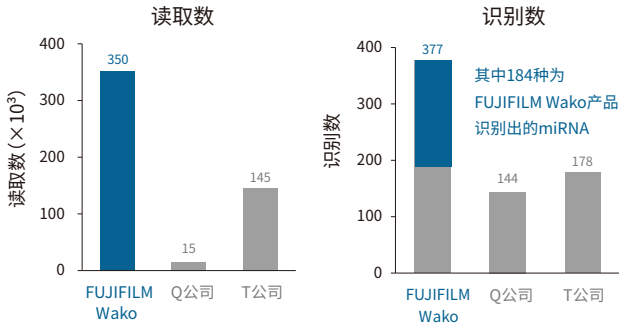
适用样品

样品: 细胞培养上清、血清和血浆中纯化的外泌体溶液
※ 暂无细胞培养上清、血清和血浆中直接提取RNA的实例
应用: RT-qPCR、微阵列分析、二代测序 (NGS) 等

性能数据

通过NGS分析外泌体miRNA

使用MagCapture™ 外泌体分离试剂盒PS Ver.2分离外泌体后，提取 RNA 并进行NGS分析。

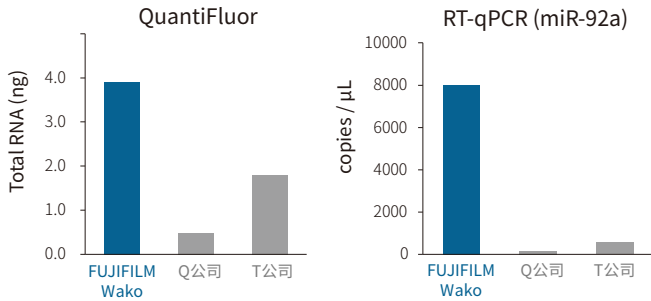


结果 与其他品牌常规产品相比，本产品检测的miRNA数量更多。

与常规产品比较RNA回收率

使用MagCapture™ 外泌体分离试剂盒PS Ver.2从脐带来源的间充质干细胞中分离外泌体，并用QuantiFluor® RNA System (Promega) 与 RT-qPCR 分别检测各试剂盒提取的RNA。

QuantiFluor® 是Promega Corporation的商标以及注册商标。



结果 与其他品牌的常规产品相比，FUJIFILM Wako产品的RNA提取效率更高。

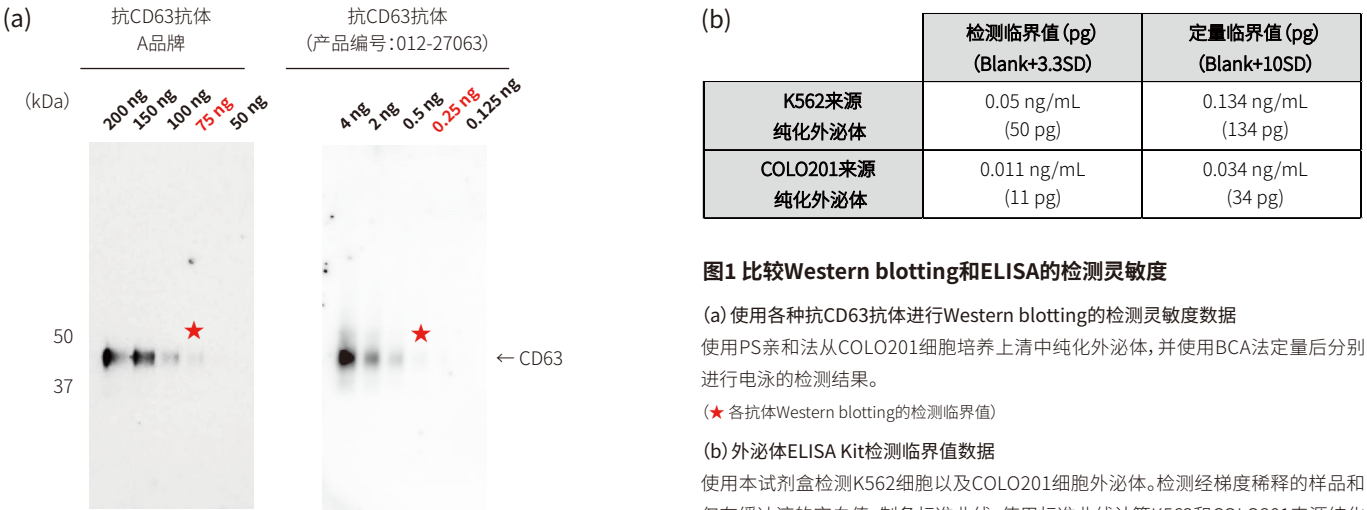
产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
294-84601	microRNA Extractor® Kit for Purified EV 纯化细胞外囊泡 (EV) 用miRNA提取试剂盒	基因研究用	20 tests

使用PS亲和法开发ELISA试剂盒

基于Tim4蛋白通过磷脂酰丝氨酸 (PS) 与外泌体特异性结合的特性, FUJIFILM Wako开发了PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD)。本试剂盒, 相比常规将外泌体表面标记物抗体固定化的ELISA试剂盒, 可更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蛋白固定化的板中, 在钙离子存在下捕获外泌体, 并通过对外泌体表面标记蛋白进行一抗反应和二抗反应, 从而实现外泌体检测。

本试剂盒的一大特点就是, 与Western blotting和传统外泌体ELISA产品相比, 可以更高灵敏度地检测外泌体。首先, 为了比较本试剂盒和Western blotting的检测灵敏度, 对Western blotting中外泌体的临界值进行了检测 (图1a)。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 (其他品牌产品A) 进行Western blotting, 可以检测出蛋白量低至75 ng的外泌体。然后用本试剂盒检测白血病来源细胞系K562细胞以及COLO201细胞来源纯化外泌体的ELISA检测临界值。结果显示, 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 1,000倍以上的检测灵敏度 (图1b)。另外, 现有的外泌体ELISA产品的灵敏度在数ng~μg之间 (参考各产品手册), 但是基于PS与Tim4蛋白特异性结合的本款试剂盒与传统的固定化外泌体表面标记抗体ELISA法相比, 灵敏度高出100倍。

此外, FUJIFILM Wako还攻克了PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD) 的难题, 为实现体液样品的检测, 通过将生物素标记抗体与HRP标记链霉亲和素结合起来开发了试剂盒PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP), 扩大了适用的样品范围。

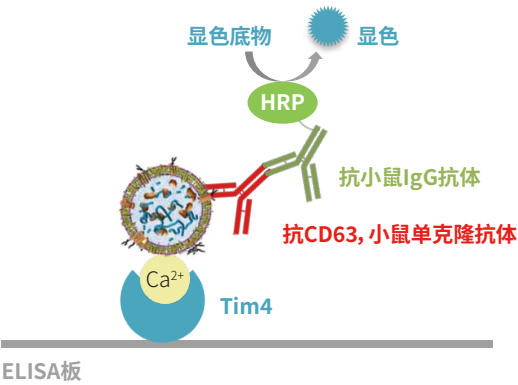


PS亲和法外泌体ELISA试剂盒

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD)

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD) 是一款使用PS亲和法, 定性分析纯化外泌体和细胞培养上清中的外泌体, 以及定量分析细胞培养上清中的外泌体的ELISA试剂盒。

检测原理



试剂盒组成

试剂盒组成	96 tests
Exosome Capture 96 Well Plate	1 plate
Plate Seal	4 sheets
Reaction/Washing Buffer (10×)	50 mL×2
Exosome Binding Enhancer (100×)	10 mL
Control Primary Antibody Anti-CD63 (100×)	120 µL
Secondary Antibody HRP-conjugated Anti-mouse IgG (100×)	120 µL
TMB Solution	12 mL
Stop Solution	12 mL

※该试剂盒不含标准品

应用数据

▼ COLO201细胞培养上清来源及人血清来源纯化外泌体的检测灵敏度比较

制备以下样品, 使用PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒、A品牌ELISA试剂盒和A品牌ELISA试剂盒 (高灵敏度型) 检测外泌体标记物CD63, 并比较检测灵敏度。

<使用样品>

- ① A品牌ELISA试剂盒配套标准品

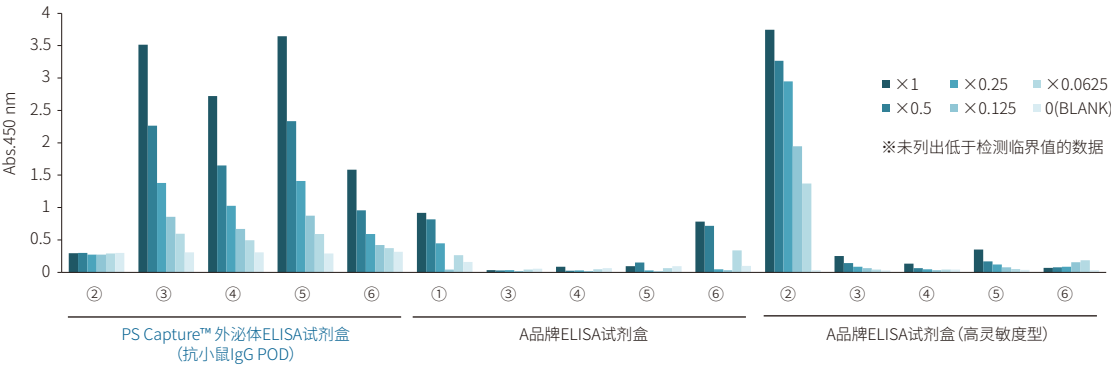
② A品牌ELISA试剂盒 (高灵敏度型) 配套标准品

③ PS亲和法纯化的COLO201细胞培养上清来源外泌体
- ④ 聚合物沉淀法纯化的COLO201细胞培养上清来源外泌体

⑤ PS亲和法纯化的人血清来源外泌体

⑥ 聚合物沉淀法纯化的人血清来源外泌体

	①	②	③	④	⑤	⑥
×1	1/16	1/1,000	40 ng/mL	160 ng/mL	800 ng/mL	2,000 ng/mL
×0.5	1/32	1/2,000	20 ng/mL	80 ng/mL	400 ng/mL	1,000 ng/mL
×0.25	1/64	1/4,000	10 ng/mL	40 ng/mL	200 ng/mL	500 ng/mL
×0.125	1/128	1/8,000	5 ng/mL	20 ng/mL	100 ng/mL	250 ng/mL
×0.0625	1/256	1/16,000	2.5 ng/mL	10 ng/mL	50 ng/mL	125 ng/mL
Blank	0	0	0	0	0	0



产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
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)	基因研究用	96 tests

可从体液样品中直接检测的PS亲和法和外泌体ELISA试剂盒

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP) 可用于定性分析以及定量分析细胞培养上清和体液样品中的外泌体。

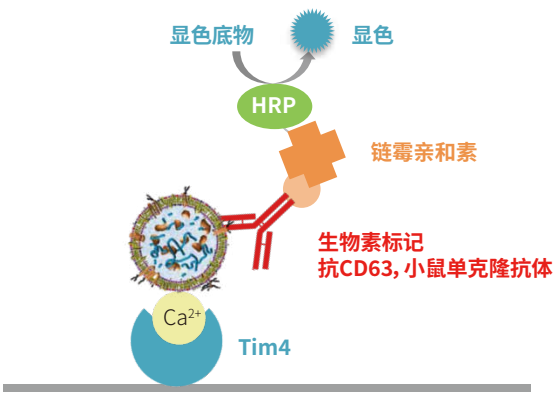
上述的PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD) 仅可使用小鼠单抗作为一抗, 但本试剂盒可以使用与生物素标记的任意物种的抗体和凝集素等作为一抗。另外本试剂盒使用HRP标记链霉亲和素作为二抗, 与血液成分的非特异性结合较低, 无需分离和纯化即可高灵敏度地检测PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD) 难以检测的血液样品中的外泌体。

特点

- 可高灵敏度定性和定量分析
 - 灵敏度比WB高50~1,000倍
 - 仅需约2.5 μL的血液样品即可检测出外泌体, 节约样品
- 无需分离外泌体, 可直接检测细胞培养上清和体液样品。
- 可以使用各种动物来源的生物素标记抗体和凝集素进行检测
- 操作简单, 再现性高

- 应用广泛
 - <应用案例>
 - 细胞培养上清与血液样品中的外泌体定性和定量分析
 - 确认EV-depleted FBS中残留的外泌体
 - 使用凝集素分析外泌体的糖链

检测原理



ELISA板

试剂盒组成

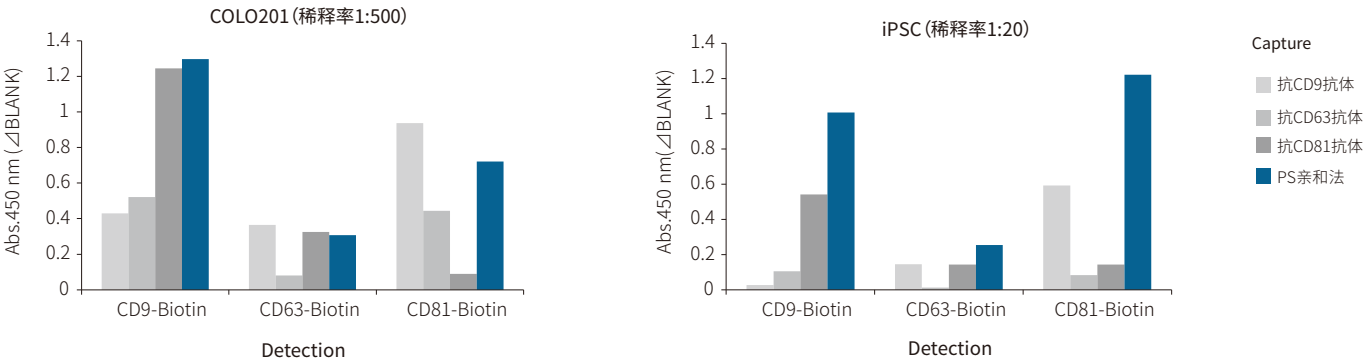
试剂盒组成	96 tests
Exosome Capture 96 Well Plate	1 plate
Plate Seal	4 sheets
Reaction Buffer	80 mL
Washing Buffer (10x)	100 mL
Exosome Binding Enhancer	10 mL
Control Biotinylated Antibody	
Anti-CD63 (100×)	120 μL
HRP-conjugated Streptavidin (100×)	240 μL
TMB Solution	12 mL
Stop Solution	12 mL

※该试剂盒不含标准品

应用数据

▼ PS亲和法VS抗体法捕获效率

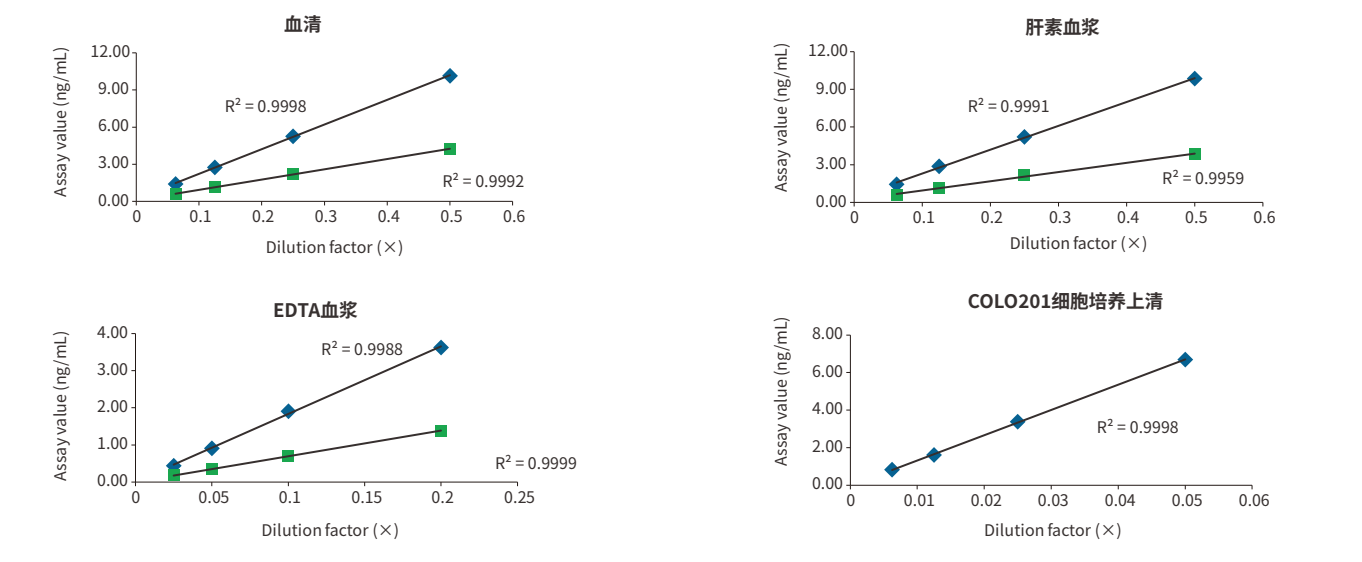
预处理 (10,000×g, 30 min) 各细胞培养上清, 并添加至已分别固定化的抗CD抗体 (CD9/CD63/CD81) 以及Tim4的微孔板的各个孔中进行反应。然后, 使用各生物素标记抗CD抗体 (CD9/CD63/CD81) 检测结合的外泌体。



结果 与抗体法相比, PS亲和法可更高效地捕获外泌体。

▼ 血液样品以及培养上清样品的稀释线性

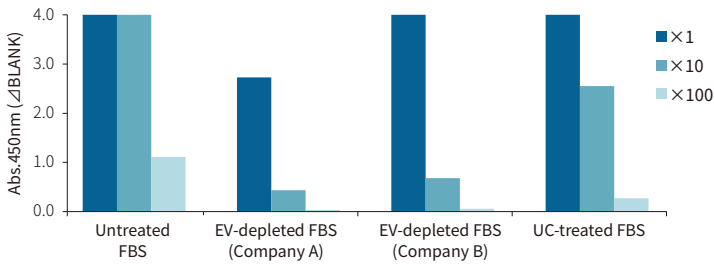
用从COLO201细胞培养上清中纯化的外泌体制备的标准曲线为基准,检测①人血清稀释样品,②人肝素血浆稀释样品,③人EDTA血浆稀释样品(各2个样品,4倍梯度稀释),以及④COLO201细胞培养上清的4倍梯度稀释样品中的外泌体浓度(检测CD63),评估各个样品的稀释线性。



▼ 确认EV-depleted FBS中残留的外泌体

使用本试剂盒检测未经处理的FBS、市售的“无外泌体血清”(EV-depleted FBS)以及超离处理的FBS(UC-treated FBS, 160,000×g, 16 h)中残留的外泌体。检测抗体使用经Biotin Labeling Kit-SH(产品编号:348-90941,同仁化学研究所)标记的抗CD9抗体(产品编号:014-27763)。

结果 使用PS亲和法可确认FBS的残留外泌体。

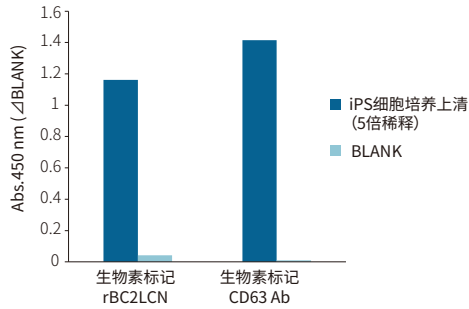


▼ 应用于糖链分析

使用本试剂盒、生物素标记抗CD63抗体(产品编号:019-27713)和生物素标记rBC2LCN凝集素检测经预处理(预处理条件: 10,000×g, 30 min)的5倍稀释iPS细胞培养上清中的外泌体。

生物素标记的凝集素为使用EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin(赛默飞世尔科技)标记的rBC2LCN(产品编号:029-18061)。

结果 可检测外泌体表面的糖链。



产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
298-80601	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP) PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)	基因研究用	96 tests

特异性检测和定量人来源外泌体

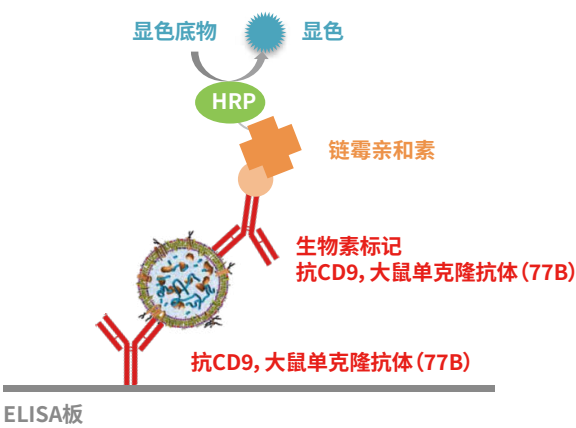
CD9/63/81-Capture 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)

CD9/63/81-Capture外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP) 是一款可用于检测和定量细胞培养上清和体液样品中外泌体的ELISA试剂盒。已分别固定化外泌体标记蛋白抗CD9/CD63/CD81抗体, 可捕获表达CD9/CD63/CD81的外泌体。此外, 这些抗体特异性结合人CD9/CD63/CD81, 从而允许检测和定量人来源外泌体。

特点

- 可特异性检测出人来源外泌体
- 无需分离外泌体, 可直接检测培养上清和血液样品中的外泌体
- 配合使用外泌体标准品, 可定量分析外泌体
- 操作简便, 再现性高

检测原理



试剂盒组成 (CD9-ELISA)

试剂盒组成	96 tests
Anti-CD9 Antibody-immobilized 96 Well Plate	1 plate
Plate Seal	4 sheets
Sample Reaction Buffer	50 mL
Antibody Reaction Buffer	50 mL
Washing Buffer (10×)	100 mL
Control Biotinylated Antibody Anti-CD9 (100×)	120 µL
HRP-conjugated Streptavidin (100×)	240 µL
TMB Solution	12 mL
Stop Solution	12 mL

※该试剂盒不含标准品

应用数据

比较人来源外泌体检测中的特异性

添加各浓度的外泌体, COLO201细胞来源, 纯化品 (产品编号: 052-09301) 至含有2倍稀释的10% FBS (经超离处理) 的D-MEM培养基, 并在两款ELISA试剂盒配套的孔板中进行反应, 使用人和牛CD9交叉反应的抗CD9抗体 (Clone No. 1K) 进行检测。

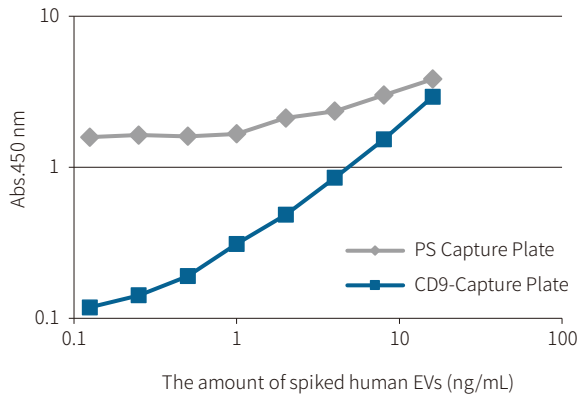
【使用试剂盒】

PS Capture Plate (PS亲和法):

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)

CD9-Capture Plate (本产品):

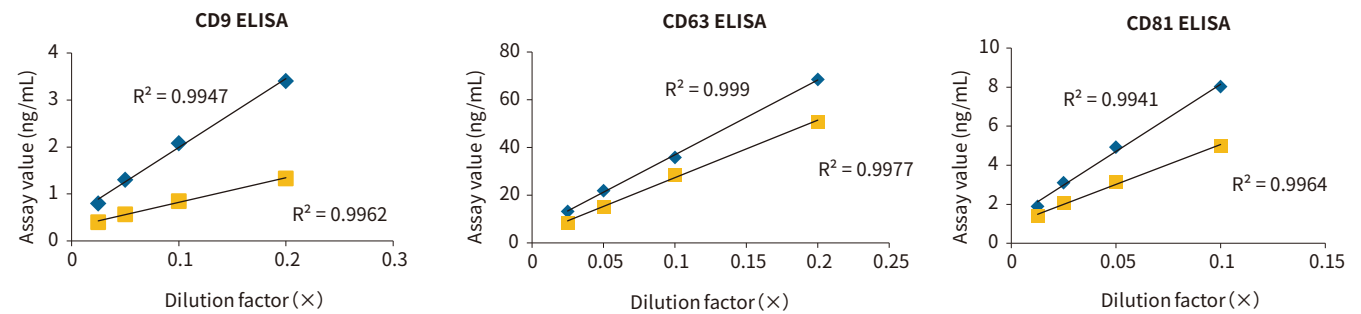
CD9-Capture人外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)



结果 PS亲和法还捕获了牛来源外泌体 (残留于经超离处理的FBS), 本产品能够特异性捕获以及高灵敏检测人来源外泌体。

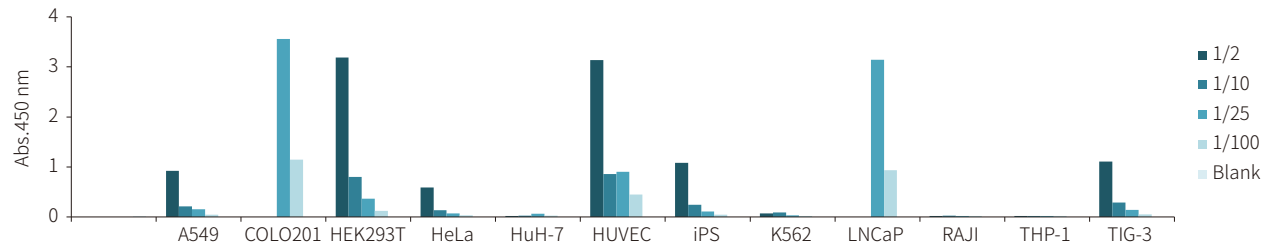
▼ 人血清样品的稀释线性

使用COLO201细胞培养上清中纯化的外泌体制备标准曲线，以此为基准检测2个人血清样品在4种梯度稀释中的外泌体浓度，评估各样品的稀释线性。

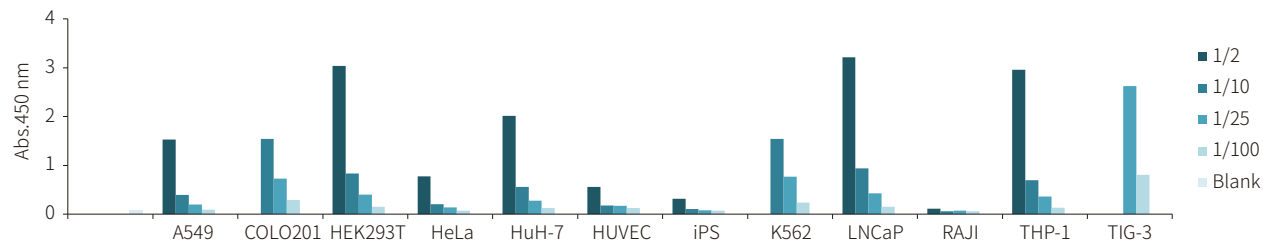


▼ 各种细胞类型中外泌体标记蛋白的分析

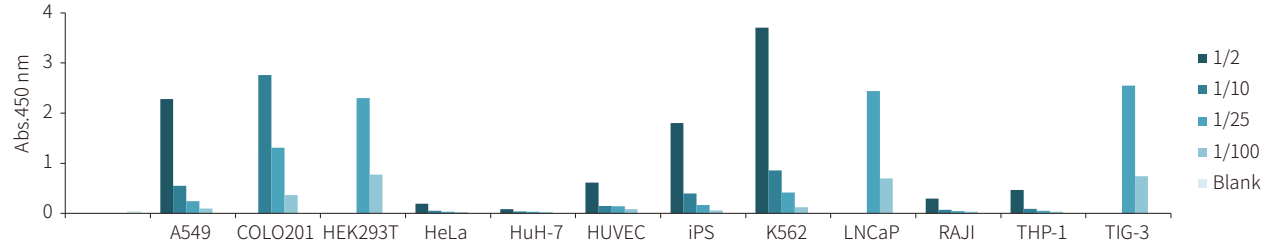
① CD9 Capture外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)



② CD63 Capture外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)



③ CD81 Capture外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)



产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
296-83701	CD9-Capture Human Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP) CD9 Capture外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)	基因研究用	96 tests
290-83601	CD63-Capture Human Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP) CD63 Capture外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)	基因研究用	96 tests
292-83801	CD81-Capture Human Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP) CD81 Capture外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)	基因研究用	96 tests

外泌体高灵敏度定性分析的理想选择

PS Capture™ 外泌体流式试剂盒

PS Capture™ 外泌体流式试剂盒是一款通过运用与磷脂酰丝氨酸 (PS) 特异性结合的Tim4蛋白和磁珠的PS亲和法, 可将外泌体固定在磁珠上, 并使用流式细胞仪高灵敏度检测标记蛋白的试剂盒。

※使用前需自行准备表面标记蛋白对应荧光染料标记一抗、或一抗以及荧光染料标记二抗。

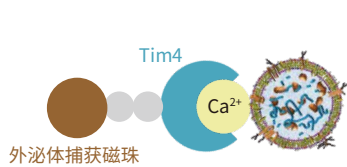
特点

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

检测原理

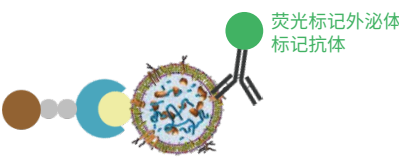
① 外泌体分离

通过外泌体捕获磁珠, 从样品中分离外泌体



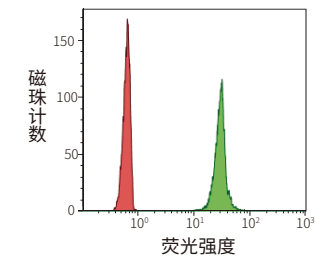
② 外泌体染色

使用荧光标记抗外泌体标记抗体染色外泌体

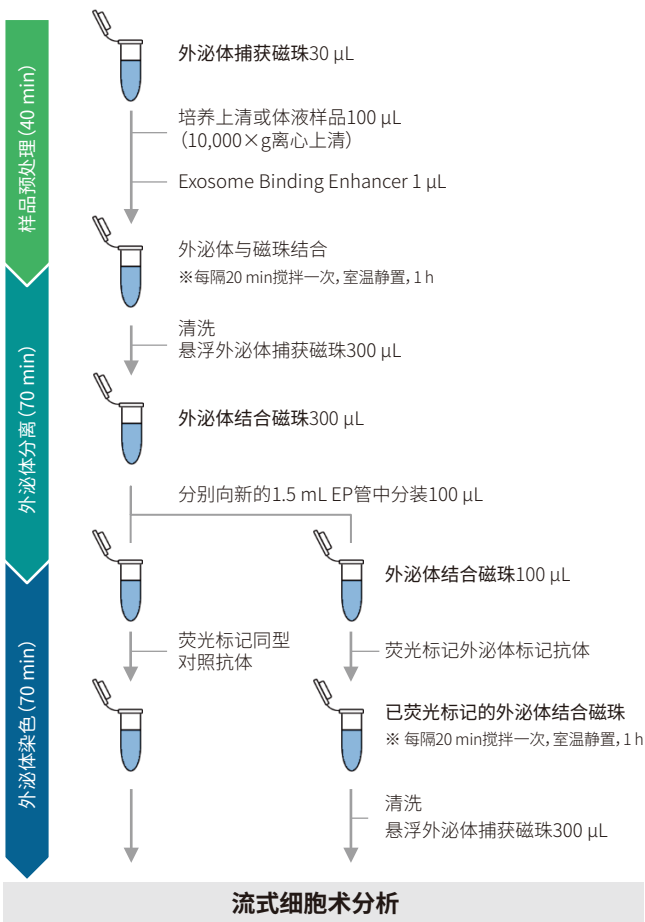


③ 流式细胞术分析

外泌体结合磁珠状态下, 进行流式细胞术分析



实验流程 (2次反应)



样品类型

- 细胞培养上清
- 血清
- 肝素血浆
- EDTA血浆

反应数量和样品量

在外泌体的分离步骤中, 基本的实验流程为使用1.5 mL EP管 (2次反应) 进行反应。若需扩大反应规模, 请按照下表扩大外泌体捕获磁珠的添加量及样品量。

※最大反应次数为10次反应 (1.5 mL EP管/反应)

反应数	外泌体捕获磁珠 (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

▼ 分析细胞培养上清中的外泌体表面抗原

使用本产品和其他品牌产品（抗CD63/CD9/CD81抗体固定化磁珠）固定化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。

【样品】

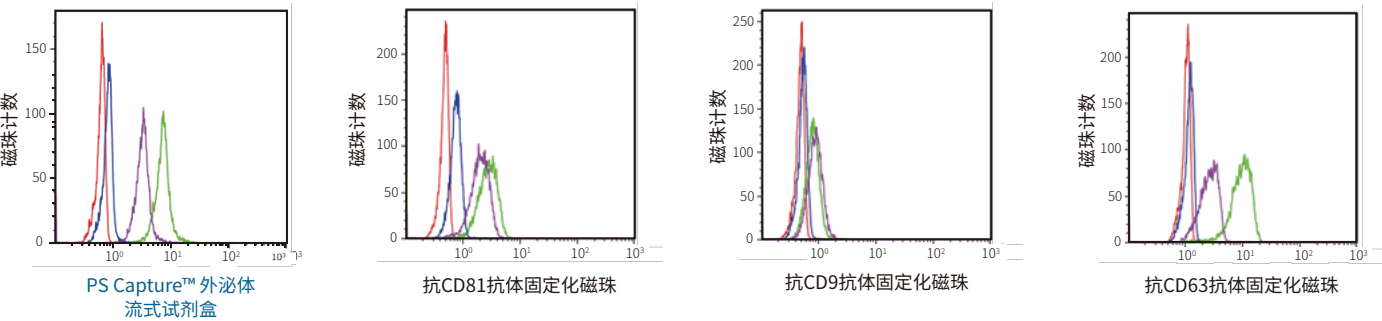
K562细胞培养上清液：33 μL/Assay

- 检测：同型对照

检测：抗CD9抗体

检测：抗CD63抗体

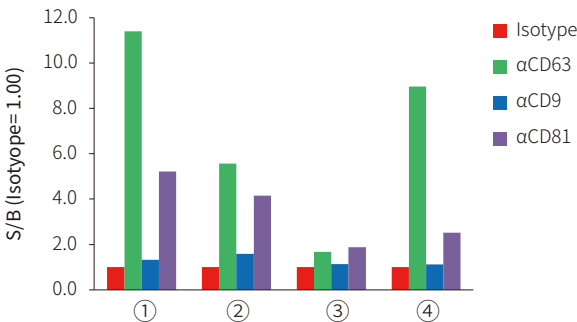
检测：抗CD81抗体



<参考>比较S/B (即Signal/Background, 信噪比)

- ① PS Capture™ 外泌体流式试剂盒
- ② 其他品牌产品：抗CD81抗体固定化磁珠
- ③ 其他品牌产品：抗CD9抗体固定化磁珠
- ④ 其他品牌产品：抗CD63抗体固定化磁珠

结果 与其他品牌产品相比，PS Capture™ 外泌体流式试剂盒可高灵敏度检测外泌体表面抗原。



▼ 分析血清和血浆中的外泌体表面抗原

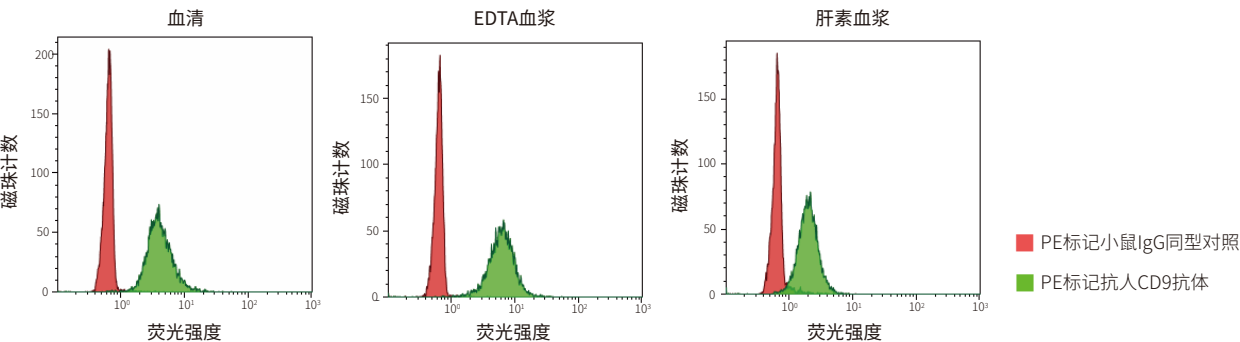
用本产品固定人血清、人血浆（EDTA血浆、肝素血浆）中的外泌体，通过PE标记小鼠IgG同型对照以及PE标记抗人CD9抗体检测外泌体。

【样品】

人血清、肝素血浆、EDTA血浆（缓冲液已更换）各100 μL

【检测抗体】

PE标记抗CD9抗体（Novus Biologicals, 产品编号：NB100-77915PE）



产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
297-79701	PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit PS Capture™ 外泌体流式试剂盒	基因研究用	300 tests

使用DNA免疫法制备的高灵敏度特异性外泌体标记抗体

抗外泌体标记抗体 (CD9/CD63/CD81)

四跨膜蛋白家族的CD9/CD63/CD81为外泌体的标记蛋白。FUJIFILM 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。

DNA免疫法

DNA免疫法是将搭载了表达载体的目标蛋白的基因导入动物体内，并使其在动物体内表达，然后使用该目标蛋白作为抗原制备抗体的技术。

由于该抗体制备方法识别天然状态蛋白，所以可制备治疗及诊断领域的抗体和膜蛋白抗体，以及中和抗体与功能性抗体等。



特点

- 高灵敏度
- 高特异性
- 高性价比
- 识别非还原样品

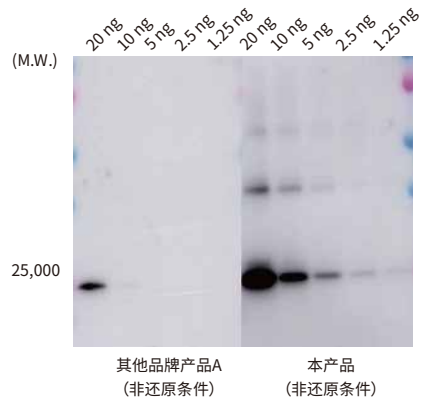
产品一览

抗原		CD9				CD63				CD81		
克隆号		1K	30B	77B		3-13				17B1	9B	
宿主		小鼠	大鼠	大鼠		小鼠				小鼠	大鼠	
交叉性*	人	++	++	++		++				++	++	
	牛	++	-	-		-				++	±	
	小鼠	-	-	-		-				-	-	
	大鼠	+	±	±		-				-	-	
标记		-	生物素	-	生物素	-	生物素	荧光素	红色荧光色素	-	-	生物素
产品编号		014-27763	019-27953	013-28171 019-28173	017-28211	012-27063	019-27713	018-27641	011-27751	011-27773	014-28221 010-28223	011-28111

※交叉性 (ELISA)： ①++:反应 ②+:轻微反应 ③±:微弱反应 ④ -:完全不反应

应用数据

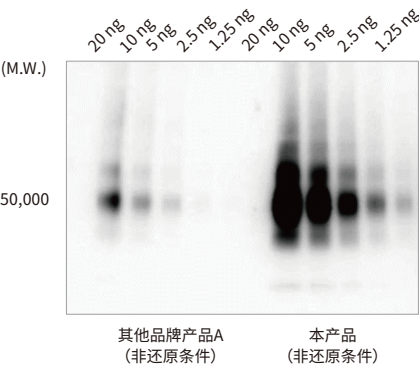
通过Western blotting比较抗CD9抗体的性能



样品: COLO201细胞来源纯化外泌体
分离方法: PS亲和法
一抗: 抗CD9, 单克隆抗体 (1k)
二抗: 过氧化物酶标记抗小鼠IgG (H+L) 抗体
检测试剂: ImmunoStar® Zeta (产品编号: 291-72401)

结果 在非还原条件下, 本产品能以更高的灵敏度检测出CD9。

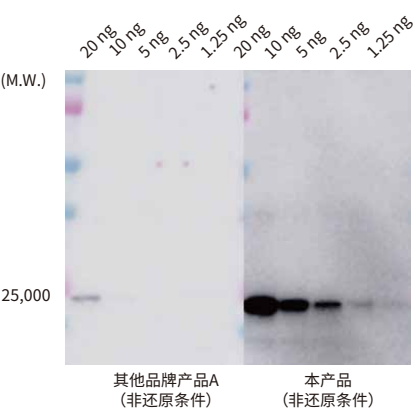
▼ 通过Western blotting比较抗CD63抗体的性能



样品: COLO201细胞来源纯化外泌体
分离方法: PS亲和法
一抗: 抗CD6, 单克隆抗体 (3-13)
二抗: 过氧化物酶标记抗小鼠IgG (H+L) 抗体
检测试剂: ImmunoStar® Zeta (产品编号291-72401)

结果 在非还原条件下, 本产品能以更高的灵敏度检测出CD63。

▼ 通过Western blotting比较抗CD81抗体的性能



样品: COLO201细胞来源纯化外泌体
分离方法: PS亲和法
一抗: 抗CD81, 单克隆抗体 (17B1)
二抗: 过氧化物酶标记抗小鼠IgG (H+L) 抗体
检测试剂: ImmunoStar® Zeta (产品编号291-72401)

结果 在非还原条件下, 本产品能以更高的灵敏度检测出CD81。

产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
014-27763	Anti CD9, Monoclonal Antibody (1K) 抗CD9单克隆抗体 (1K)	免疫化学用	100 μL
019-27953	Anti CD9, Rat Monoclonal Antibody (30B) , Biotin Conjugated 抗CD9大鼠源单克隆抗体 (30B), 生物素偶联		100 μL
013-28171	Anti CD9, Rat Monoclonal Antibody(77B) 抗CD9大鼠单克隆抗体 (77B)		20 μL
019-28173			100 μL
017-28211	Anti CD9, Rat Monoclonal Antibody(77B) , Biotin Conjugated 抗CD9大鼠单克隆抗体 (77B), 生物素偶联		50 μL
012-27063	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13) 抗CD63单抗 (3-13)		100 μL
019-27713	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Biotin Conjugated 抗CD63单克隆抗体 (3-13), 生物素偶联		100 μL
011-27751	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Red Fluorochrome(635) Conjugated 抗CD63单克隆抗体 (3-13), 红色荧光染料 (635) 偶联		25 tests
011-27773	Anti CD81, Monoclonal Antibody (17B1) 抗CD81单克隆抗体 (17B1)		100 μL
014-28221	Anti CD81, Rat Monoclonal Antibody(9B) 抗CD81, 大鼠单克隆抗体 (9B)		20 μL
010-28223			100 μL
011-28111	Anti CD81, Rat Monoclonal Antibody(9B), Biotin-conjugated 抗CD81, 大鼠单克隆抗体 (9B), 生物素偶联		50 μL

具有外泌体吸附抑制和冷冻保存作用的聚合物试剂

EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂

EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂是一款可抑制外泌体吸附于样品管或枪头等实验器具的聚合物试剂。能防止实验和保存过程中由于吸附引起的外泌体损耗, 提高回收率。可在样品的超滤、纯化和保存前添加本产品。

特点

- 抑制培养上清中以及纯化后的外泌体吸附于实验器具
- 在反复冻融中保护外泌体
- 操作简单, 只需向样品中添加本品即可
- 已确认不影响以下实验的外泌体分析:
纳米粒子追踪分析 (NTA) /Western Blotting/ELISA/微阵列/细胞培养

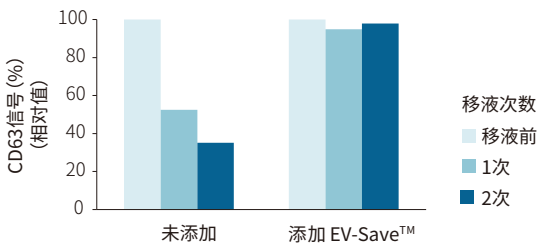
注意:
本产品用于血清、血浆或杂质较多的样品时, 难以获得理想的防吸附效果。
本产品含有聚合物, 若聚合物会影响后续的实验结果, 请勿使用本产品。

应用数据

EV-Save™ 的吸附抑制效果

添加EV-Save™ 至使用PS亲和法纯化的COLO201细胞来源外泌体, 静置 3 min。然后转移到另外的样品管, 重复本步骤。使用PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD) (产品编号: 297-79201) 检测试管内的外泌体量 (CD63信号)。

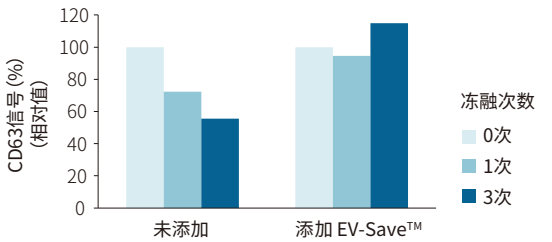
结果 更换试管 (即移液) 后CD63信号减弱, 但通过添加EV-Save™ 几乎能完全抑制更换试管引起的信号减弱。



EV-Save™ 的冷冻保护效果

添加EV-Save™ 至使用PS亲和法纯化的COLO201细胞来源外泌体后进行冻融。使用PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD) (产品编号: 297-79201) 检测样品管内的外泌体量 (CD63信号)。

结果 冻融后CD63信号减弱, 但通过添加EV-Save™ 可抑制冻融引起的信号减弱。

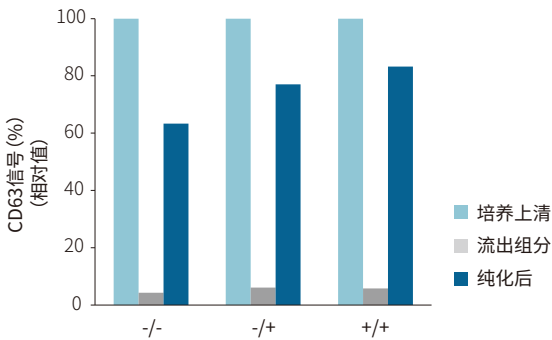


配合PS亲和法使用

使用PS亲和法从TIG3细胞培养上清中纯化外泌体的过程中, 验证添加EV-Save™ 是否能抑制外泌体的损耗。

	在培养上清中添加EV-Save™	在Elution Buffer中添加EV-Save™
- / -	×	×
- / +	×	○
+ / +	○	○

结果 细胞培养上清及PS亲和法获取的洗脱缓冲液中添加了EV-Save™ 的实验组 (+/+), 与两者均未加入EV-Save™ 的实验组 (-/-) 相比, 外泌体的回收量增加了约20%。



产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
058-09261	EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂 (超滤用)	基因研究用	1 mL

可用于实验动物的外泌体给药

EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂 (动物体内实验用)

EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂 (动物体内实验用) 的组成成分仅使用具有医药添加剂使用实例的成分，是一款可用于外泌体给药实验动物的外泌体吸附抑制剂和冷冻保护剂。

特点

- 仅使用具有医药添加剂使用实例的成分
- 抑制培养上清中及纯化后的外泌体吸附于实验器具
- 在反复冻融中保护外泌体
- 操作简单，只需往样品中添加本品即可
- 已确认不影响以下实验的外泌体分析：
纳米粒子追踪分析 (NTA) /ELISA/荧光染色/向细胞中添加外泌体的实验

注意：
本产品用于血清、血浆或杂质较多的样品时，难以获得理想的防吸附效果。
不能用于超滤。需要超滤时，请使用EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂 (P24)。

EV-Save™ (超滤用) 与EV-Save™ (动物体内实验用) 的比较

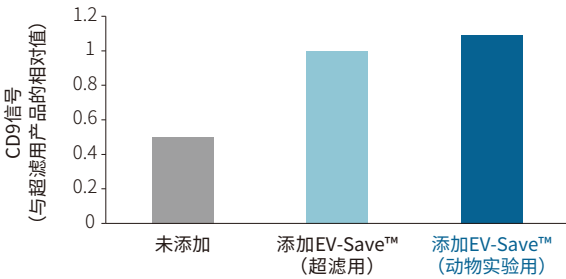
	EV-Save™ (动物体内实验用) 产品编号:050-09461	EV-Save™ (超滤用) 产品编号:058-09261
向体外排出	使用可排出体外的分子量成分	暂无数据
组成成分	仅使用具有医药添加剂使用实例的成分	含无医药使用实例的成分
用于动物实验	√	暂无数据
用于超滤	×	√

应用数据

吸附抑制效果

添加EV-Save™ (超滤用) 和EV-Save™ (动物实验用) 至PS亲和法纯化的COLO201细胞来源外泌体，在4℃下存储16 h。然后，使用PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP) (产品编号:298-80601) 检测样品管内的外泌体量 (CD9信号)。

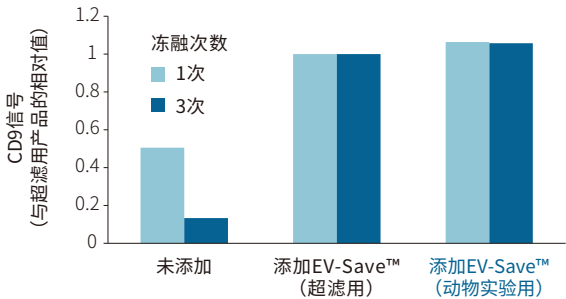
结果 在未添加EV-Save™ 的情况下，外泌体量 (CD9信号) 减弱，但添加EV-Save™ (超滤用) 和EV-Save™ (动物体内实验用) 后可抑制信号减弱。



冷冻保护效果

添加EV-Save™ (超滤用) 和EV-Save™ (动物实验用) 至PS亲和法纯化的COLO201细胞来源外泌体，反复冻融1次或3次。然后，使用PS Capture™ Exosome ELISA Kit (链霉亲和素HRP) (产品编号:298-80601) 检测样品管内的外泌体量 (CD9信号)。

结果 在未添加EV-Save™ 的情况下，冻融后CD9信号减弱，但添加EV-Save™ (超滤用) 和EV-Save™ (动物实验用) 后可抑制信号减弱。



产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
050-09461	EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent for in vivo EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂 (动物体内实验用)	基因研究用	1 mL

外泌体实验阳性对照用

COLO201细胞来源纯化物外泌体

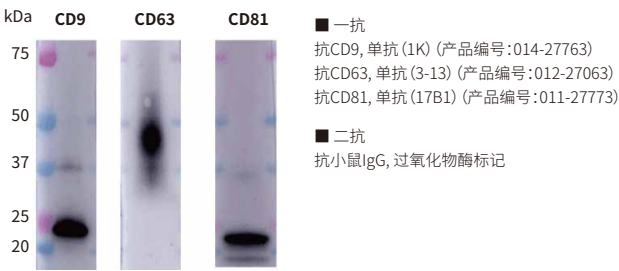
使用PS亲和法分离的COLO201细胞来源高纯度纯化外泌体。

特点

- 高纯度
- 高稳定性
- 未冻干
- CD9/CD63/CD81蛋白阳性外泌体

应用数据

检测外泌体表面标记蛋白 -CD9/CD63/CD81-

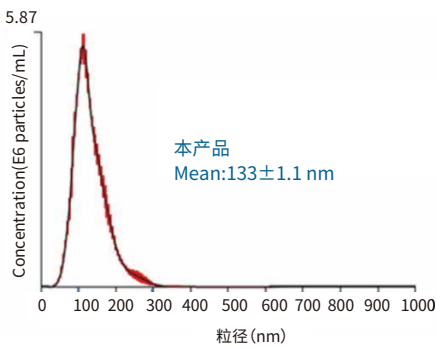


进行非还原SDS-PAGE处理后, 将本产品以10 ng/Lane上样, 用抗体检测外泌体表面标记蛋白CD9/CD63/CD81。

结果 确认可高水平表达各外泌体表面标记蛋白。

分析外泌体粒径

使用NanoSight分别分析本产品和其他品牌产品的粒径。

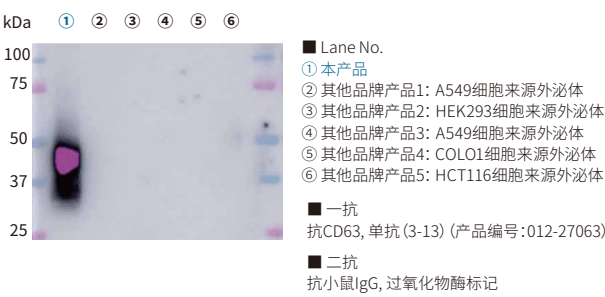


结果 本产品的粒径均一度更高。

产品信息

特性: 溶液
组成: 外泌体、TBS、EDTA、聚合物 (稳定剂)
外泌体浓度: 10 µg /mL※
※ 根据CD63信号值进行修正的蛋白浓度

检测外泌体表面标记蛋白 -与其他品牌产品比较-



使用本产品和其他品牌的5种外泌体作为样品, 比较是否能检测出CD63信号。各制造商产品的浓度均为10 ng/Lane。

结果 仅从本产品中检测出CD63信号。

产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
052-09301	Exosomes, from COLO201 cells, purified 外泌体, COLO201细胞来源, 纯化物	基因研究用	50 µL

间充质干细胞专用增殖培养基

MSCulture™ High Growth基础培养基 / MSCulture™ High Growth添加剂

MSCulture™ High Growth基础培养基及配套添加剂是一款血清添加型增殖培养基,可以使间充质干细胞 (MSC: Mesenchymal Stem Cell) 在高质量状态下高效增殖。适用于各种组织来源 (骨髓、脂肪、脐带基质) 的MSC。与常规的MEMα或MSC增殖培养基相比,该产品拥有更高的增殖能力。

使用本产品扩增培养后,再配合EV-Up™ 间充质干细胞外泌体生产用培养基 (P28) 及配套添加剂,可高效地生产大量外泌体。

特点

- 高增殖率
- 可无扁平化高品质培养MSCs
- 配合使用EV-Up™ 可高效生产外泌体
- 无动物来源成分

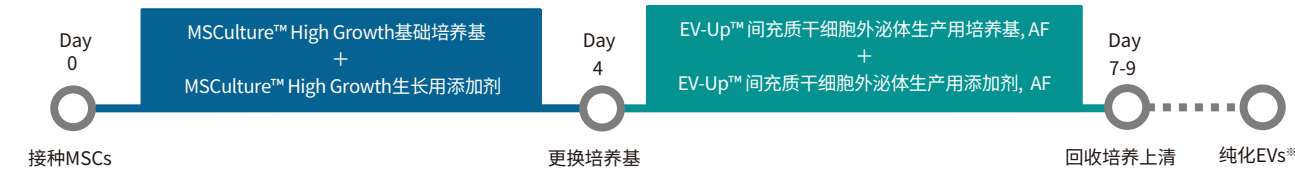
(※如后续不添加血清,则本培养基不含动物来源成分)

适用细胞

- 骨髓来源MSC
- 脂肪来源MSC
- 脐带基质来源MSC

本产品可用于多种组织来源MSC的培养。

使用方法 (示例)



※推荐使用PS亲和法的MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver. 2 (P11) 纯化回收的外泌体。

性能数据

细胞增殖能力比较

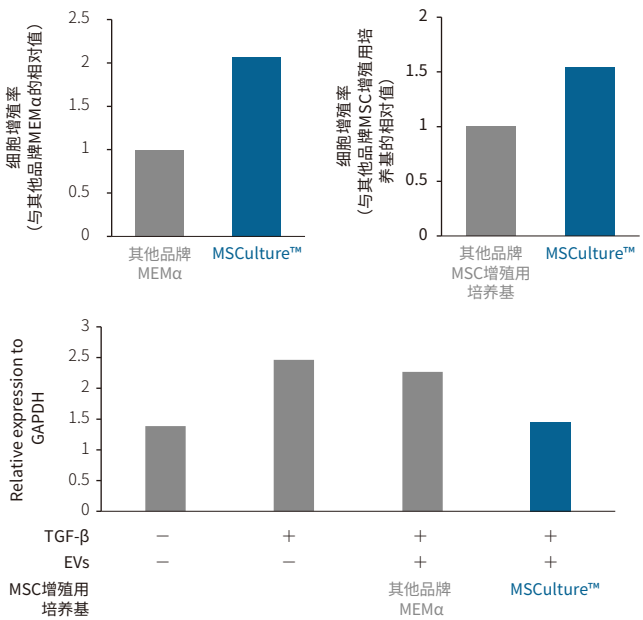
分别使用其他品牌的MEMα、MSC增殖用培养基与本产品培养骨髓来源MSC, 比较其细胞增殖能力。

结果 与其他品牌的MEMα、MSC增殖培养基相比, 本产品的细胞增殖率更高。

抗纤维化活性比较

分别使用其他品牌的MEMα与本产品增殖骨髓来源MSC后, 更换EV-Up™ 间充质干细胞外泌体生产用培养基生产外泌体, 并且使用PS亲和法从培养上清中纯化外泌体。取 5×10^7 particles/mL纯化外泌体添加至经TGFβ刺激的人胚胎肺来源成纤维细胞, 并且通过定量纤维化标志物 (Collagen V) 基因表达, 比较抗纤维化活性。

结果 使用本产品增殖的MSC来源外泌体, 抑制了TGFβ诱导的Collagen V表达。



产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
132-19345	MSCulture™ High Growth Basal Medium MSCulture™ 生长用基础培养基	细胞培养用	500 mL
133-19331	MSCulture™ High Growth Supplement MSCulture™ 生长用添加剂	细胞培养用	5 mL

间充质干细胞 (MSC) 用外泌体生产培养基

EV-Up™ 间充质干细胞外泌体生产用基础培养基, AF

EV-Up™ 间充质干细胞外泌体生产用添加剂, AF

EV-Up™ 间充质干细胞外泌体生产用培养基是一款间充质干细胞 (MSC) 专用的外泌体 (EVs) 生产培养基, 不含血清及其他动物来源成分。只需将添加剂添加至基础培养基, 即可作为完全培养基使用。

■ 特点

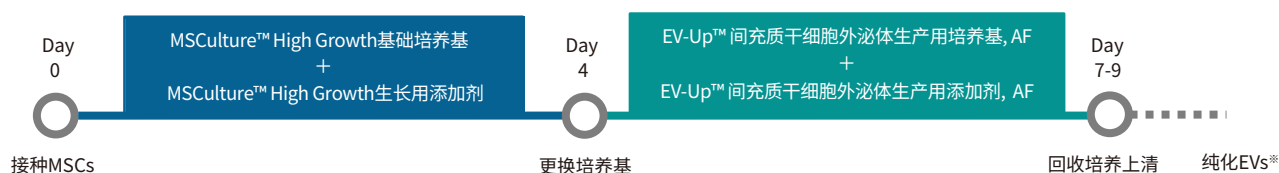
- 与血清培养基相比, 外泌体生产量高
- 提高外泌体的生物活性
- 维持MSC的高存活率

■ 适用细胞

- 骨髓来源MSC
- 脂肪来源MSC
- 脐带基质来源MSC

本产品可用于多种组织来源MSC的培养。

■ 使用方法 (示例)

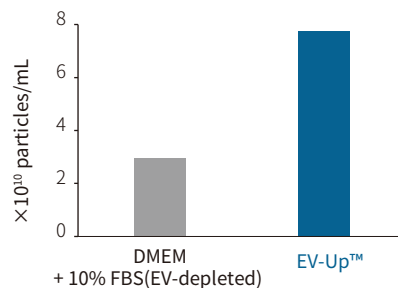


※推荐使用PS亲和法的MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver. 2 (P11) 纯化回收的外泌体。

■ 应用数据

▼ 外泌体粒子数

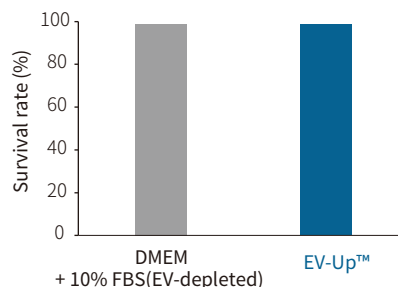
通过NanoSight的Nanoparticle Tracking Analysis检测使用PS亲和法从各培养基的培养上清中纯化的外泌体的粒子数。



结果 使用EV-Up™ 培养的MSC释放的外泌体粒子数是传统培养基培养的2.6倍左右。

▼ 细胞存活率

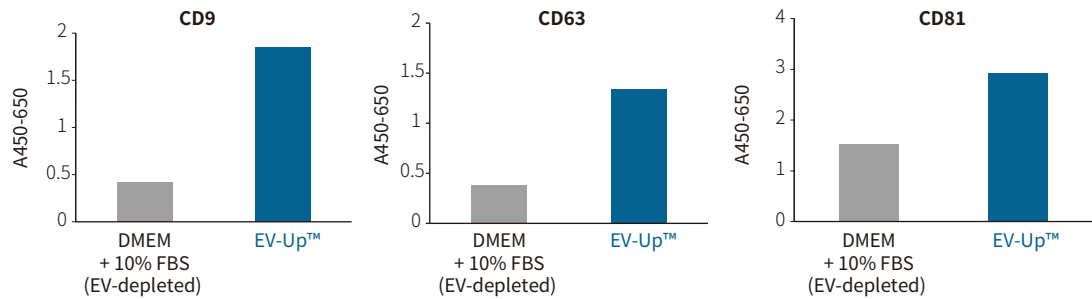
将在血清培养基中扩增培养的人骨髓来源MSC用不同培养基培养5天, 然后检测产生外泌体后的细胞存活率。



结果 EV-Up™ 培养的MSC与传统培养基相比, 显示相同的高细胞存活率。

▼ 外泌体标志物蛋白表达

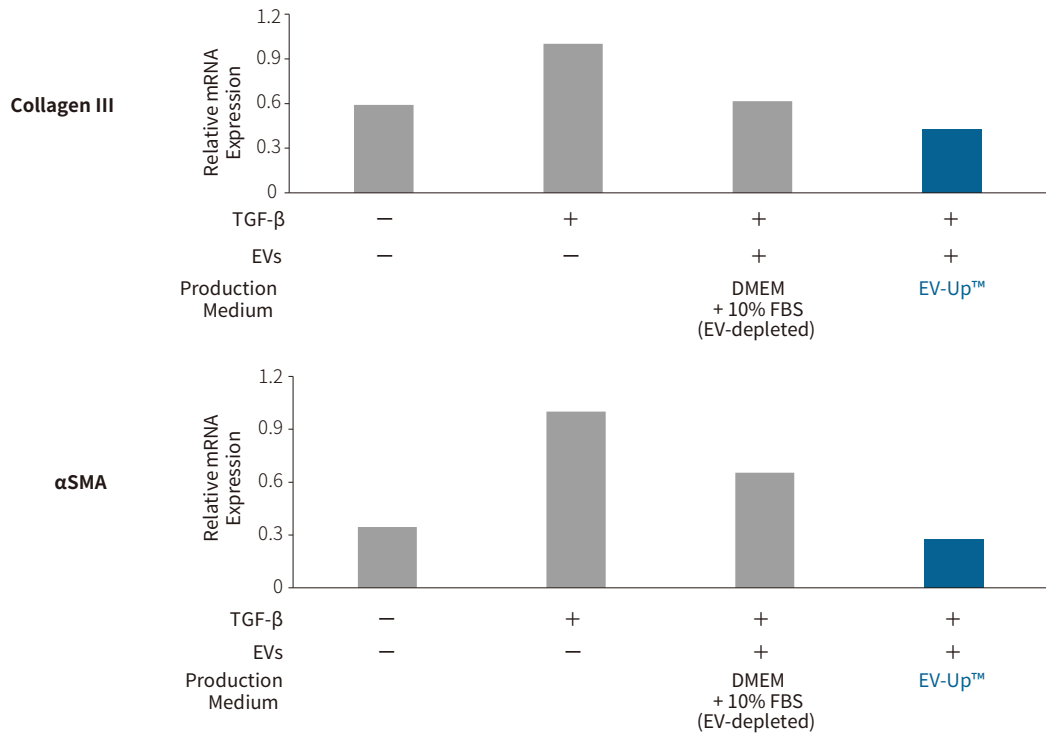
使用PS亲和法从培养上清中纯化外泌体，并通过ELISA检测标记蛋白CD9、CD63和CD81的表达。



结果 与传统培养基相比，EV-Up™ 的培养上清含有更多外泌体标记蛋白。

▼ 抗纤维化活性

将使用PS亲和法从各培养基的培养上清液中纯化的外泌体 (5×10^8 particles/mL) 添加至经TGFβ刺激的人胎肺来源成纤维细胞 (TIG3细胞) 中。然后，用RT-PCR定量纤维化标志物 (Collagen III, αSMA) 的mRNA，比较其抗纤维化活性。



结果 与传统培养基相比，使用EV-Up™ 培养的MSC生产的外泌体的抗纤维活性更高。

产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
053-09451	EV-Up™ EV Production Basal Medium for MSC, AF EV-Up™ 间充质干细胞外泌体生产用基础培养基, 无动物源成分	细胞培养用	95 mL
298-84001	EV-Up™ MSC EV Production Supplement, AF EV-Up™ 间充质干细胞外泌体生产用添加剂, 无动物源成分	细胞培养用	100 mL用

水平连接型共培养容器

UniWells™ 水平连接细胞共培养板

UniWells™ Horizontal Co-Culture Plate是两个孔水平连接的新型共培养容器。传统的共培养板都是使用上下共用培养液的细胞培养板,存在上下层培养条件不同以及无法同时观察上下层细胞的缺点。本产品为水平连接,既能在相同条件下培养细胞,还能同时观察细胞。



■ 特点

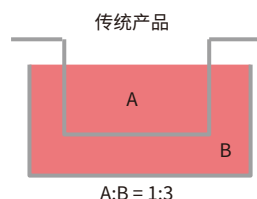
- 可以使用延时显微镜同时观察
由于无需调整焦距,可以同时观察左右两个培养板中的细胞。只要使用适配托盘(配套),就可用于各类显微镜。
- 可以在相同条件下培养细胞
相同培养基量和相同底部材料。
- 可以使用任意的滤膜
可以插入市售滤膜,防止两个板间的细胞混合。
- 可以单独培养各种细胞
可以自由组合拼接,将细胞分开培养。



UniWell™ Horizontal Co-Culture Plate (1 set)
※滤膜需另外购买

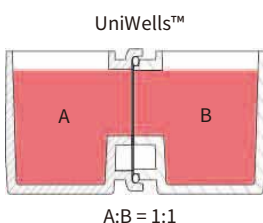
■ 水平共培养的优点是什么?

▼ 实验培养基量相同



A:B = 1:3

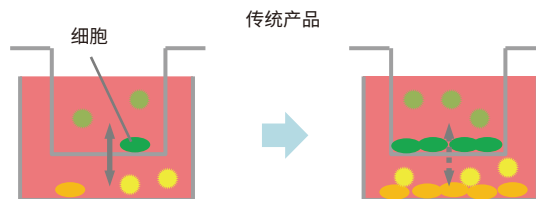
传统的纵向培养容器下方的培养基量较多,会稀释上方的细胞分泌因子。



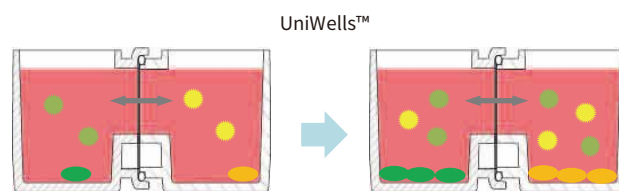
A:B = 1:1

UniWells™ 可以在左右的培养基量相同的情况下进行培养。

▼ 细胞不会堵塞过滤器



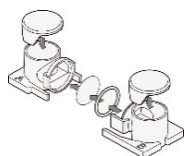
传统的纵向培养容器细胞会堵塞滤膜,阻碍细胞分泌因子的通过。



即使细胞增殖也不会堵塞UniWells™ 中的过滤器。

■ 使用方法

▼ 连接使用

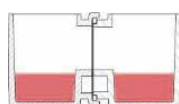


将滤膜、O型密封环、盖子接在一起。

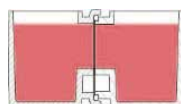
※滤膜需另行购买

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

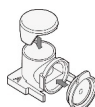


非共同培养状态



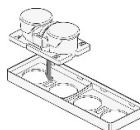
共同培养状态

▼ 单独使用



将通用盖和盖子合上即可使用。

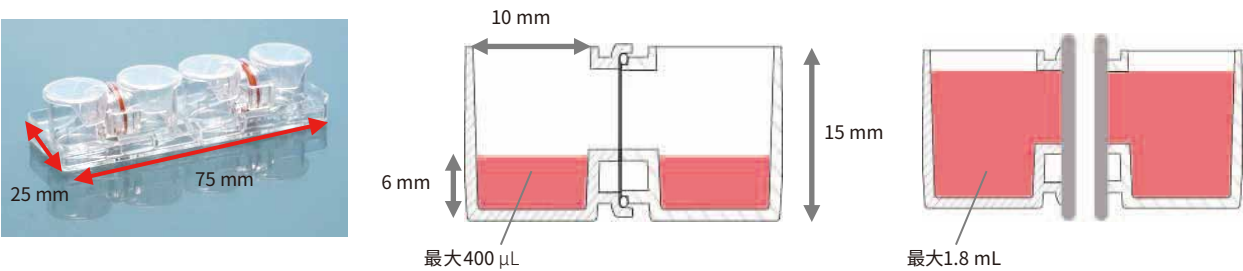
▼ 显微镜下使用



置于适配器中,就可以简单地在显微镜下观察细胞。

规格

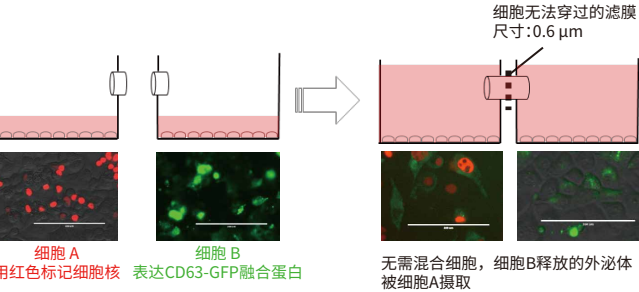
UniWells™ 本体附属的适配器与一般的载玻片大小相同。如左图所示, 适配器能够并排放置两个连接后的培养容器。



应用数据

外泌体摄取

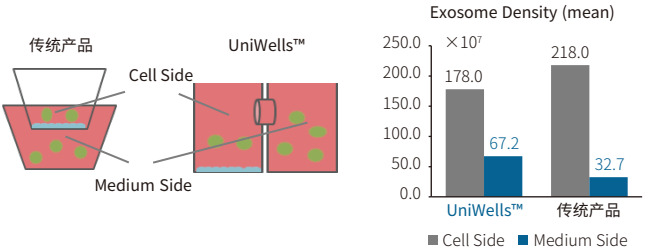
使用UniWells™ Horizontal Co-Culture Plate进行实验, 检测细胞释放的外泌体扩散后, 能否通过滤膜被另外的细胞摄取。



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

外泌体渗透率的比较

将相同数量的细胞接种到传统共培养容器或UniWells™ 的一个孔中。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。本实验中两个共培养器中的培养基总量相同。



结果 与传统共培养容器相比, UniWells™ 共培养容器中通过滤膜的外泌体数量更多。

产品编号	产品名称	生产商	产品规格
384-14421	UniWells™ Horizontal Co-Culture Plate UniWells™ 水平共培养板	Ginrei Lab	10 sets
381-14431	UniWells™ Filter 0.03 µm UniWells™ 滤膜0.03 µm		50张
388-14441	UniWells™ Filter 0.6 µm UniWells™ 滤膜0.6 µm		50张
380-19261	UniWells™ Filter 1.2 µm UniWells™ 滤膜1.2 µm		50张
388-17001	UniWells™ Adapter 96 UniWells™ 共培养板96孔板适配器		1个

MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver. 2

■ 关于PS亲和法

Q1: 外泌体和微囊泡可以分开提取吗?

由于无法明确区分外泌体和微囊泡的大小, 所以无法将二者完全分开。推荐使用下列简单的分离方法以获得各主要组分:

纯化外泌体等粒子直径小的细胞外囊泡 (Small EVs) 时, 请选用 $10,000 \times g$ 离心后的上清样品;

纯化含有微囊泡的大粒径细胞外囊泡 (Large EVs) 时, 首先回收 $1,200 \times g$ 离心的上清, 然后将其 $10,000 \times g$ 离心分离获得的沉淀用TBS悬浮后作为样品使用;

如果同时纯化上述两种细胞外囊泡, 请使用 $1,200 \times g$ 离心分离的上清作为样品。

Q2: 可以分离除外泌体和微囊泡以外的物质吗?

已确认会回收带包膜的病毒。由于包膜病毒的膜表面也会暴露PS, 因此在混有包膜病毒的样品中会同时回收外泌体和病毒。利用这个特点也可将本试剂盒应用于包膜病毒的回收实验。以下论文报告了使用PS亲和法进行病毒纯化:

<参考文献>

M.Santiana, et al.: *Cell Host & Microbe*, 24, 208(2018).

若想分离病毒, 则需使用本试剂盒回收后, 用病毒特异性抗体进行亲和性纯化。除适用于FUJIFILM Wako的试剂盒外, 本方法也适用于针对包膜上存在CD63等外泌体标记的抗体的纯化法。

Q3: 所有的外泌体都会暴露PS吗?

如P9所述, 使用NTA法、ELISA法比较PS亲和法纯化前后样品中所含的EV数, 结果显示, 无论使用何种细胞或体液样品, 均可回收约90%的EV。

另外, 与超速离心法或尺寸排除法相比, 用PS亲和法纯化的EV中低阴离子性EV的比例更高, 高阴离子性的EV比例更低。

Q4: 与其他分离方法相比的优势是什么?

● 超速离心法

与超速离心法相比, 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。还能从超速离心法难以沉淀的样品中回收外泌体。回收的外泌体纯度高, 可回收与超速离心法和密度梯度离心结合使用的相同等级的高纯度外泌体。

● 聚合物沉淀法

与聚合物沉淀法相比, 本试剂盒的回收效率更高, 而且可获得更高纯度的外泌体。

● 抗体亲和法

抗体亲和法使用的是外泌体表面抗原相对应的抗体, 需使用变性剂洗脱或在酸性条件下分离回收外泌体。而本试剂盒是在中性环境下使用螯合剂进行洗脱的, 因此能回收完整的外泌体。此

外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高。

■ 关于样品

Q5: 可以从哪些样品中纯化外泌体?

细胞培养上清、血清、血浆 (肝素以及EDTA)、尿液、粪便中均有回收成功的实例。另外, 也有用户报告了在脑脊液和唾液中成功纯化外泌体的实例。

Q6: 可以从哪些动物中分离外泌体?

人、小鼠、大鼠、犬、猴等中均有分离成功的实例。

Q7: 纯化所需的样品量的下限是多少?

为了使样品稳定地与磁珠混合, 使用旋转混合器反应时, 请准备500 μ L以上的样品; 使用试管混合器时, 请准备100 μ L以上的样品。

若使用的样品量少于上述的量请添加TBS至最低上样量以上, 再与外泌体捕获固定化磁珠反应。另外, 补平用TBS中推荐添加EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂或动物体内实验用EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂。

Q8: 可以从大量的样品中回收外泌体吗?

可通过浓缩处理进行回收。使用细胞培养上清进行回收的上限为50 mL。请将离心分离预处理完成的50 mL细胞培养上清超滤浓缩至1 mL (推荐超滤管: Sartorius Viva Spin 20截留分子量100 K、产品编号: VS2041)。可兼容无血清培养基及10% FBS添加培养基。血清样品无法浓缩, 因此使用上限为1 mL。

Q9: 超滤浓缩中推荐使用的截留分子量为100 K, 可以使用10 K的吗?

FUJIFILM Wako对100 K、300 K、1000 K的超滤管进行了比较, 根据浓缩时间和浓缩外泌体量的结果, 我们推荐使用100 K的超滤管。虽然10 K和30 K的超滤管也可以使用, 但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, 则可能会降低回收效率。

■ 关于回收量

Q10: 一次实验所获得的外泌体量大概是多少?

根据样品的种类以及用量不同, 所回收的外泌体量也会有所差异。FUJIFILM Wako将施用莫能菌素钠以促进外泌体分泌的5 mL K562培养上清浓缩至1 mL, 然后进行纯化。一次纯化操作可获得约30 μ g/mL的蛋白 (BCA法检测), 粒子数为 $1 \sim 2 \times 10^{10}$ particles/mL (NanoSight LM10检测)。

另外, 从1 mL正常人混合血清中纯化一次, 可回收约34 μ g/mL的蛋白, 粒子数约为 5×10^9 particles/mL。

MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver. 2

Q11: 外泌体的回收量上限是多少?
一次实验的回收上限为 $1\sim5\times10^{10}$ particles/mL。

■ 关于试剂盒的组成与操作方法

Q12: 洗脱液的成分有哪些?
洗脱液是以PBS为基础的溶液, 含有1 mmol/L的螯合剂和盐。若以上成分会阻碍后续分析, 请通过超滤 (Sartorius VivaSpin500, 截留分子量100 K, 产品编号: VS0141) 或凝胶过滤替换合适的缓冲液。

Q13: 本试剂盒有需要特别注意的操作吗?
① 在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, 请在确保磁珠不发生凝集的同时进行充分重悬。

Q14: 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可过夜进行。

Q15: 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, 使用过的磁珠可回收利用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无污染的情况下, 10 tests用的试剂盒可进行50次反应。以上操作推荐在样品体积大于1 mL或需要从浓缩样品中回收外泌体的情况下进行。

Q16: 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, 请使用自行配制的含0.05w/v%叠氮化钠的1×TBS。重悬后, 4℃冷藏保存, 且请尽快使用。

■ 关于产品应用

Q17: 分离后的细胞外囊泡可用于什么分析?
因为可获得完整的细胞外囊泡, 所以可以用于各种分析:
<分析示例>
● 蛋白分析: 蛋白电泳、Western blotting、质谱分析、流式细胞术、ELISA
● 核酸分析: qPCR、微阵列、二代测序
● 粒子分析: 电镜分析、NanoSight分析 (NTA)
● 功能分析: 动物体内外的给药实验

Q18: 各种实验需要的细胞外囊泡的量大概是多少?
下表为FUJIFILM Wako实例的样品量:

实验	样品量 (例)
电镜分析	$2\sim4\times10^{10}$ particles/mL
微阵列分析	COLO201: 4.6×10^{10} particles TIG3: 1.7×10^{10} particles iPS: 1.9×10^9 particles
质谱分析	纯化外泌体约1 µg
Western blotting	洗脱液100 µL中, 取15 µL

Q19: 分离的细胞外囊泡能够保存多久?
添加EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂后, 可保存12个月。

Q20: 分离的细胞外囊泡, 是否可直接添加至细胞中进行后续实验?
Ver.2与FUJIFILM Wako的旧版MagCapture™ 外泌体提取试剂盒 PS Ver.2相比, 降低了细胞毒性, 能够直接用于体内外的给药实验。但若是洗脱缓冲液中的EDTA会干扰后续实验, 则需要更换缓冲液。

■ 疑难解答

Q21: 纯化效果不好该怎么办?
可准备阳性对照样品。阳性对照可通过培养HEK293等任意细胞, 制备所需的细胞培养上清量后, 使用FUJIFILM Wako的试剂盒分离外泌体即可获得。另外, 培养基中的细胞外囊泡数量较少也可能导致纯化效果不佳。如遇此情况, 可尝试扩大培养规模。

Q22: 为什么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?
由于使用其他方法回收的外泌体样品中存在许多杂质, 所以其总蛋白量会变多。而本试剂盒纯化的外泌体样品虽然总蛋白量少, 但样品纯度高, 因此实际上获得的外泌体量并不比其他方法少。

Q23: 为什么磁力架收集磁珠的效果不好?
可能是由于样品中螯合剂的作用成分 (柠檬酸等) 导致磁珠组成成分的铁发生氧化, 降低了吸附能力。

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD/链霉亲和素HRP)

■ 关于性能

Q1:PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒与三款CD-Capture外泌体ELISA试剂盒相比,哪个灵敏度更高?

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒的灵敏度更高。已确认Tim4与外泌体标记抗体 (CD9/CD63/CD81) 相比,能够更高效地捕获大范围的细胞外囊泡。

■ 关于样品

Q2:检测使用的样品量下限是多少?

以蛋白量为基准, 1 ng左右的细胞外囊泡即可检测, 由此可推算COLO201细胞培养上清纯化细胞外囊泡检测下限为11 pg (根据细胞系不同, 检测下限也会随之变化)。

Q3:可以直接检测血清和血浆样品吗?

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP) 可以直接检测。但PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD) 配套的检测二抗会与人、小鼠、大鼠的IgG发生非特异反应, 因此不适用于直接检测人、小鼠、大鼠的血清和血浆样品。

Q4:可以直接检测细胞培养上清样品吗?

两款试剂盒都可以直接检测。由于试剂盒配套的抗体不会与牛IgG发生非特异性反应, 因此可直接检测无血清培养基和FBS添加培养基的细胞培养上清。

Q5:哪些细胞是拥有纯化实例以及检测实例的细胞?

下表为FUJIFILM Wako已测试的细胞系:

Q6: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) 左右的培养上清和体液样品即可充分检测。建议用于培养基中细胞外囊泡量随时间变化的检测以及新型细胞培养上清样品的分析。但由于细胞类型 (iPS细胞等) 不同, 可能会出现培养基中细胞外囊泡量较少的情况。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。

■ 关于试剂盒组成

Q7: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均有差异, 并且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纯化的标准品。

Q8:一定要制备标准品吗?制备标准品时是否必须使用亲和法?

定量检测时, 请制备细胞外囊泡作为标准品。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亲和法纯化的细胞外囊泡作为标准品 (详细制备方法请参考试剂盒的使用说明书)。

Q9: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, 可选择想检测的表面标记小鼠抗体, 然后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, 可选择任意的表面标记检测用生物素标记抗体, 然后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, 可使用同仁化学研究所的Biotin Labeling Kit对非标记抗体进行生物素标记。

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

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD/链霉亲和素HRP)

■ 关于试剂盒的操作方法

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。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。

Q11: 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的步骤可保存于4°C, 过夜反应。

Q12: 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, 因此不可循环使用。

■ 疑难解答

Q13: 无法顺利进行检测, 应该检查哪一个步骤?

- 使用的各个试剂是否都在有效期内
- Washing buffer中是否有添加Exosome Binding Enhancer (100×)
- 如使用试剂盒配套的对照抗体也无法确认到信号, 请考虑CD63的表达量是否低于检测下限, 或是其他原因。

CD9/CD63/CD81-Capture外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)

■ 关于性能

Q1: PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒与三款CD-Capture外泌体ELISA试剂盒相比, 哪个灵敏度更高?

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒的灵敏度更高。已确认Tim4与外泌体标记抗体 (CD9/CD63/CD81) 相比, 能够更高效地捕获大范围的细胞外囊泡。

■ 关于试剂盒的操作方法

Q2: 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的步骤可保存于4°C, 过夜反应。

PS Capture™ 外泌体流式试剂盒

■ 关于样品

Q1: 本试剂盒可以用于哪些动物?

有人、小鼠、牛、猴子的使用实例。

Q2: 检测使用的样品量下限是多少?

1个样品需要33 μL左右。但样品中所含的细胞外囊泡较少时, 请将已经过离心处理的培养上清进行超滤浓缩后再上样。

(推荐超滤管: Sartorius Vivaspin20, 截留分子量100 K, 产品编号: VS2041)

Q3: 如何检测已纯化的外泌体样品?

将纯化完成的外泌体稀释至适当的浓度后, 请按照使用说明书中的“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水对试剂盒配套的Washing Buffer (10×) 进行10倍稀释。可检测出纯化外泌体的浓度范围为125~1000 ng/mL。检测抗体推荐使用抗CD63单克隆抗体 (3-13), 红色荧光色素 (635) 结合。

■ 关于试剂盒组成

Q4: MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver.2 (产品编号: 294-84101) 适用于流式细胞术吗?

不适用。建议使用磁珠和washing buffer的成分均根据流式细胞术检测条件进行优化的PS Capture™ 外泌体流式试剂盒。

Q5: 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抗体和红色荧光色素结合抗CD63抗体等适用的荧光标记抗体需另行购买。

Q6: 可以使用荧光标记二抗进行检测吗?

可以。分离外泌体后, 请按照以下操作进行一抗反应、二抗反应和流式细胞术分析:

- ① 混合未标记的一抗和外泌体捕获磁珠, 室温静置1 h。分别在20 min, 40 min, 1 h时涡旋振荡约5 s, 并搅拌磁珠;

PS Capture™ 外泌体流式试剂盒

- ② 使用300 μ L WB (+Enhancer) 清洗2次;
- ③ 使用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中的磁珠;
- ④ 室温静置1 h。期间在20 min, 40 min, 1 h时涡旋振荡约5 s, 并搅拌磁珠;
- ⑤ 使用300 μ L WB (+Enhancer) 清洗3次;
- ⑥ 在300 μ L WB (+Enhancer) 中重悬磁珠;
- ⑦ 使用流式细胞仪进行分析。

■ 关于应用

Q7: 本试剂盒可以用于定量分析吗?

不能。定量分析需要确定一粒磁珠能够捕获的外泌体数量, 由于本产品无法保证这一点, 因此无法用于定量分析。

■ 疑难解答

Q8: 多个外泌体捕获磁珠与外泌体结合, 磁珠聚集怎么办?

根据前向和侧向散射光为单线态磁珠部分设门参数, 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样品的50%~70%。

Q9: 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, 有时难以用目测确认磁珠集磁。进行清洗操作前, 将样品管静置于磁力架上至少1 min, 小心缓慢地进行移液操作, 避免枪头吸到磁珠。

EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂

■ 关于应用

Q1: 添加了本试剂的纯化外泌体样品该如何用于蛋白质组学分析?

使用以下方法去除EV-Save™ 后即可进行分析:

- ① 添加纯化EV样品5倍体积的冷丙酮, 颠倒混合均匀;
- ② -20°C静置1 h;
- ③ 1500 $\times$ g, 10 min, 4°C进行离心;
- ④ 去除上清;
- ⑤ 重复步骤①~④三次;
- ⑥ 打开盖子, 静置风干1h (RT);
- ⑦ 溶于20 μ L 9 M Urea, 20 mM HEPES-NaOH, pH 8.2。

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

