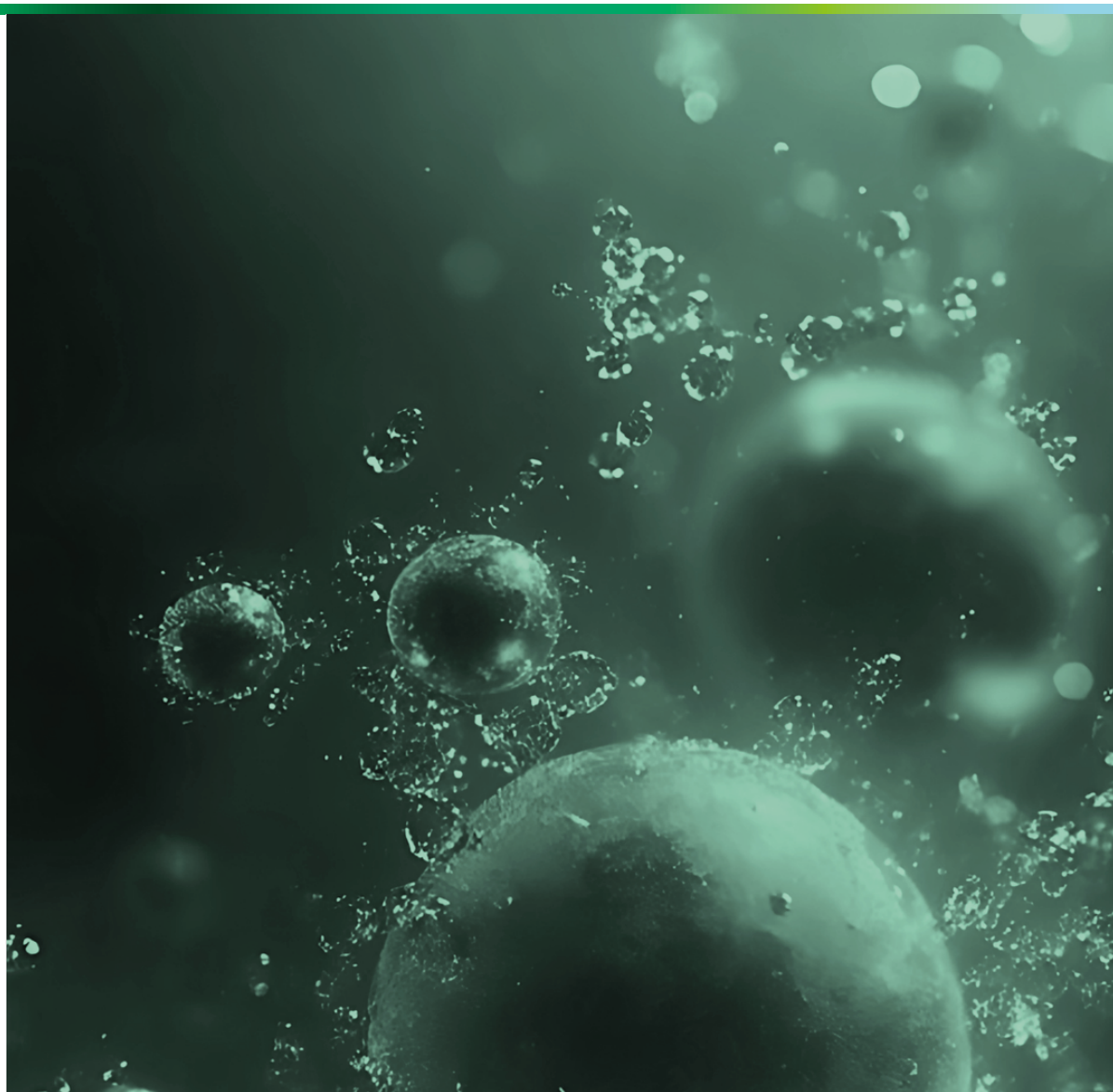


细胞外囊泡&外泌体

科研产品手册



综述

【细胞外囊泡研究的基础与应用——国际标准化和PS亲和法】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

细胞外囊泡分离与纯化技术的挑战 6

使用磷脂酰丝氨酸和Tim4的细胞外囊泡分离和纯化方法 6

EV分离和纯化方法的比较 6

PS亲和法的性能数据 7

【专栏】不能仅凭蛋白总量计算外泌体回收量的原因 8

金泽大学 纳米生命科学研究所 华山力成教授问答集《PS亲和法的优点与常见问题》 10

顶尖细胞外囊泡研究者见解:PS亲和法的优势 11

PS亲和法助力全球科研:应用PS亲和法的研究文献 12

分离/纯化

MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver.2 13

MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS 15

MassivEV™ EV纯化分离柱PS 17

EV分离和纯化试剂盒的选择指南..... 19

吸附抑制和冷冻保存

EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂 20

EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂 (动物体内实验用) 21

EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂 (TFF用) 22

检测与定量

使用PS亲和法开发ELISA试剂盒 23

外泌体ELISA试剂盒选择表 23

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD) 24

PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP) 25

CD9/CD63/CD81-Capture人外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP) 27

PS Capture™ 外泌体流式试剂盒 29

抗外泌体标记抗体 (CD9/CD63/CD81) 31

细胞培养与外泌体生产

MSCulture™ High Growth基础培养基及配套添加剂 33

EV-Up™ MSC EV生产用基础培养基/添加剂, AF 34

纯化EV

外泌体, COLO201细胞来源, 纯化物 35

RNA分析

纯化EV用RNA提取试剂盒 36

纯化EV用RNA定量试剂盒 37

蛋白质分析

LysoPure™ Protein Extraction-PTS Solution 38

EV-Perm™ 外泌体膜渗透处理用试剂盒 39

细胞间相互作用分析

UniWells™ 水平连接细胞共培养板 40

Q&A

Q&A 41

细胞外囊泡研究的基础与应用

——国际标准化和PS亲和法



华山力成 教授

金泽大学纳米生命科学研究所
(WPI-NanoLsi)

1. 前言

人体中约有37万亿个细胞，通过细胞间通讯维持着重要的生理功能。通常这种细胞间通讯的研究主要聚焦于细胞因子、激素以及其他可溶性因子介导的机制展开。然而，近年来，由细胞外囊泡(Extracellular Vesicles: EVs)——一种脂质双分子层包裹的纳米颗粒介导的信息传递机制受到了广泛关注。

EVs是由细胞分泌的、直径30-1000 nm的脂质双分子层包裹的囊泡，携带蛋白质、脂质、核酸和代谢物等多种生物活性分子。因这些分子受脂质双分子层的保护，在细胞外环境中可保持稳定，还可向远距离靶细胞传递生物信息。

2007年一项里程碑式的研究发现，EVs内含有源自分泌细胞来源的mRNA和miRNA，并能将这些遗传信息传递给受体细胞，从而参与细胞间的基因表达信息交换¹⁾。自此，EVs作为一种新型的细胞间通讯机制，引发了全球研究热潮。2011年，国际细胞外囊泡学会(ISEV)成立，此后发布了一系列指南，确保EV研究的严谨性和可重复性。最新的国际指南MISEV 2023，是基于超过1,000多名研究者的反馈意见制定的，提供了涵盖实验设计、EV分离、表征、功能分析及结果报告等全流程指导，旨在实现不同研究间的高度可重复性²⁾。

早期的研究主要聚焦于EV囊泡内的“货物”，近期的研究则日益关注“EV冠”这一概念，即EV分泌后吸附在其表面的外源分子。有报告³⁾指出，血液以及体液中丰富的载脂蛋白、补体系统成分、细胞外基质相关蛋白质等会结合在EV表面，并可能影响EV的功能及其与靶细胞的相互作用。MISEV 2023指南明确建议，在对EV进行分析和报告时，不仅应关注其内部成分，还应考虑此类外源性分子的作用。这一视角对于未来的研究至关重要。

2. 分类与命名

2.1 概念框架

MISEV 2023指南为全面解析细胞外环境中存在的多分子聚集体，构建了一套全新的概念框架²⁾。在该框架中，细胞外颗粒(EPs)被定义为最高层级的分类，其可广泛地分为两类：一类是由脂质双分子层包裹形成的细胞外囊泡(EVs)，另一类是不具备膜结构的非囊泡性细胞外颗粒(NVEPs)。NVEPs包括脂蛋白颗粒、核糖核蛋白颗粒、蛋白质聚集体、外切体等。这些颗粒与EVs在物理化学性质上往往存在重叠，因此依靠传统的分离方法难以将它们完全分开。指南

进一步强调，NVEPs在数量上可能远超EVs，并且在使用许多分离方法时，两者常会混杂在一起。

2.2 EVs亚型分类

此前一直依据EVs生物发生途径对其进行分类。外泌体(粒子直径30-150 nm，来源于多囊泡内体)、胞外体(粒子直径100-1000 nm，来源于细胞质膜)和凋亡小体(来源于死亡细胞膜)，这些分类在概念上可用于描述细胞外囊泡的异质性，因此在早期研究中被广泛采用。

然而MISEV 2023提醒，需谨慎使用此类基于生物发生途径的术语。在实践中，从技术层面难以严谨地验证特定的EV群体究竟来源于内体区室还是直接来源于细胞质膜。因此，除非其生物发生途径经过明确的实验验证，否则不应使用此类术语。此外，在现行的MISEV框架中，凋亡小体未被明确定义为独立的细胞外囊泡类别。

据此，MISEV 2023推荐采用主要依据物理特征的客观命名体系。其中，以约200 nm为粒子直径阈值，将细胞外囊泡分为小细胞外囊泡和大细胞外囊泡的分类方式，已成为当前的通用标准。在适当情况下，应提供包括密度、表面标志物表达、以及生产或分离条件在内的附加描述信息，以准确、透明地描述EV制备物。

3. 临床转化

3.1 作为诊断标志物的应用

EVs受广泛关注的核心原因之一是其与临床应用直接相关，尤其是在诊断领域具备变革性的应用潜力。常规组织活检难以获取深部脏器和中枢神经系统的相关信息，而通过分析血液、尿液、唾液等体液中的EVs，以微创的方式获得上述信息，这也让液体活检成为研究热点。

在肿瘤学领域，肿瘤细胞来源的循环EVs，其浓度、表面标志物表达模式及囊内micro RNA谱，与健康人群的EVs存在显著差异。目前多项临床研究已逐步推进，将这些特征应用于多种癌症的早期诊断⁴⁾。此外，PS亲和法等高灵敏度分离检测技术的出现，实现了对以往难以识别的微量肿瘤来源EVs的高精度检测。这些技术进展有望提高诊断准确性，尤其是包括I期癌症在内的早期癌症的诊断。

在神经系统疾病领域，据报道能穿过血脑屏障(BBB)的脑源性EVs作为潜在的诊断标志物也备受关注。在阿尔茨海默病、帕金森病

以及相关疾病中,已在EVs中检测到 β -淀粉样蛋白、磷酸化tau蛋白、 α -突触核蛋白等病理性蛋白,据报道外周血中这类蛋白的含量与疾病进展存在相关性⁵⁾。

MISEV 2023强调,在生物标志物的发现过程中,考虑NVEPs的共存现象以及EV冠相关外源性因素的影响至关重要。具体而言,必须将EVs的固有信号与其分泌后在体液中与EV结合的分子加以区分,并在研究报告中对这一区别进行清晰的记录。遵循上述国际标准,对于保证研究结果的可重复性、推动研究成果的临床转化至关重要,进而使基于EVs的诊断技术能发展为更可靠的平台,实现对癌症和神经退行性疾病的早期检测与疾病监测。

3.2 作为治疗药物的临床应用

除诊断外, EVs还可作为天然纳米载体,能高效递送核酸与治疗药物,与人工合成脂质体和脂质纳米颗粒(LNPs)⁶⁾相比,具备更优异的生物相容性与靶向潜力。因此,近年来基于EVs疗法的临床开发迅速扩展。截至2025年1月, ClinicalTrials.gov上已注册292项EVs相关临床试验,其中170项旨在评估治疗效果⁷⁾。特别是间充质干细胞来源的EVs已被证实具有抗炎与组织修复活性,在心肌梗死、肝损伤、肾损伤等多种疾病模型中均展现出治疗效果。

2024年,美国食品药品监督管理局(FDA)批准了神经来源EVs的新药临床试验申请(IND),据报道,该类EVs在全身给药后,可发挥抗炎与神经保护作用,且可穿越血脑屏障(BBB)⁷⁾。此外,2025年,脐带间充质干细胞来源的EVs已推进至治疗脑梗死的1b期临床试验;与此同时,针对骨关节炎的首款人源EVs关节腔内给药临床试验正式启动,初步临床结果令人鼓舞⁷⁻⁸⁾。

总体而言,这些研究表明EVs从再生医学到神经系统疾病及癌症治疗具有广泛的治疗应用潜力。尤其是其被证实可进入中枢神经系统的特性,为历来难以治疗的疾病开辟了新的治疗可能性。

3.3 EV工程化

天然EVs虽具备优异的生物相容性与组织穿透性,但其治疗应用仍面临诸多挑战,包括循环半衰期短、靶向特异性有限,以及对治疗性载物的装载量和组成难以精准调控。为攻克上述局限性,研究人员已开发出多种EVs工程化策略⁹⁻¹⁰⁾。

基因工程法可将外源基因导入EVs生产细胞,从而使特定功能的分子整合至EVs中。在我们实验室,已成功制备出可同时表达抗原-主要组织相容性复合体I类复合物、共刺激分子CD80及细胞因子IL-2的工程化EVs。研究证实,该工程化EVs可在体内有效激活抗原特异性CD8阳性T细胞,并诱导产生强效的抗肿瘤免疫应答¹¹⁾。

化学与物理工程法则是在EVs分离纯化后对其进行修饰,以赋予其额外功能。例如,可通过电穿孔或纳米穿孔技术将核酸或小分子药物封装入EVs内;也可通过点击化学或表面包被策略,将特定配体或聚合物偶联至EVs表面。

这类工程化策略带来的优势可归纳如下:①改善EVs的循环稳定性;②增强EVs的靶向特异性;③提高治疗分子的装载效率与可控性;④实现对免疫应答的有效调控;⑤可广泛应用于多种疾病的治疗。工程化改造在保留天然EVs固有生物相容性的同时,弥补了其自身的局限性,该技术有望在下一代治疗平台的研发及最终的临床应用中发挥核心作用。

4. PS亲和法

4.1 研发背景与技术优势

为实现上述临床应用,能够高效分离纯化高纯度EVs的技术不可或缺,PS亲和法正是为满足这一需求而研发的创新型解决方案。

传统上,超速离心法已被广泛应用于EVs的分离。然而,由于该方法基于物理性质实现分离(粒子直径、密度),往往导致所得产物纯度有限,且伴有蛋白质聚体及其他非囊泡组分的显著污染。MISEV 2023明确比较了常用分离方法的回收率和特异性,并指出超速离心法通常回收率相对较高,但其特异性有限²⁾。

与此相比,PS亲和法是一种模拟内源性EVs识别机制的仿生学方法,并在MISEV 2023中被明确列为代表性的以亲和法为基础的分离策略。该方法利用肝、脾等器官中巨噬细胞表面表达的Tim4受体能特异性结合EVs膜外层暴露的磷脂酰丝氨酸(PS)的特性实现分离¹²⁾。健康细胞中,PS通常仅分布于细胞质膜内层,而在EVs表面,PS会发生外翻暴露,这一特性让PS亲和法能够高效、全面地捕获EVs群体。

PS亲和法的核心优势在于,它可广泛分离不同亚型或不同细胞来源的EVs群体。CD9/CD63/CD81这类四跨膜蛋白是常用的EVs表面标志物,但其表达模式因EVs产生细胞的类型和生理状态而异。例如在某些情况下,CD63阳性EVs可能仅占EVs总数的约20%。相比之下,PS虽然表面密度有所差异,但在约90%的EVs上均有表达,因此能够实现更全面的EVs回收与分析¹³⁾。

此外, Tim4与PS的结合具有钙依赖性,因此可通过EDTA处理在温和条件下实现EVs的温和释放与回收。该特性能够在分离纯化过程中保证EVs的结构完整与生物活性。MISEV 2023着重强调,对EVs的分析需在保留其天然状态的前提下进行,从这一角度而言,PS亲和法是一种理想的EVs分离策略。

4.2 在基于EV的药物开发中的应用

从基于EVs的药物开发角度来看,PS亲和法相较于切向流过滤法(TFF)也具备显著优势。TFF虽适用于大规模处理,且被广泛应用于浓缩和放大生产,但其依赖于膜孔径,易同时分离出脂蛋白与蛋白聚集体。此外, EVs在过滤过程中会受到机械应力的影响,存在膜完整性受损、内容物受影响的风险。

相比之下,PS亲和法基于生理性配体-受体相互作用实现高特异性捕获,可实现高纯度EVs的回收。重要的是, EVs的纯化与定量可基于同一原理进行,该特性使其能无缝应用于EVs药物的生产、分析表征及质量控制全流程。同时,该方法从微量到大体积样本均具有良好的可扩展性,保持方法学的一致性,因此适用于从早期研究到符合GMP要求生产的整个药物开发流程。

综上所述,PS亲和法可在分离高纯度EVs的同时保留其结构与功能,具备直接支持制药应用的核心特性。相较于TFF,该方法的各项优势更利于基于EVs的药物转化,因此有望成为支撑未来EVs疗法研发的核心技术。

5. 展望

5.1 技术发展方向

MISEV 2023将单颗粒水平分析技术列为技术发展一个尤为重要的方向。高灵敏度流式细胞术、纳米颗粒追踪分析、基于荧光的颗

粒追踪技术及扫描探针显微镜,正日益实现对EVs在单颗粒水平上的精准分析。将这些技术与PS亲和法结合时,可将EVs固定在基于Tim4的载体上进行单颗粒成像¹⁴⁾,也可通过EDTA处理温和洗脱后进行高灵敏度流式细胞术的单颗粒分析¹⁵⁾。这些互补的技术手段,能够以极低的非特异性背景信号,获取高准确度的单颗粒水平信息。

此外,将PS亲和法与自动化蛋白质组学样品前处理技术相结合,可在96孔板水平上实现大样本量队列分析,从而助力高通量的生物标志物发现¹⁶⁾。同时,整合蛋白质组学、转录组学、代谢组学和脂质组学等多组学分析技术,能够全面解析EVs的分子组成特征。将人工智能和深度学习应用于这些庞大且复杂的数据集,有望支持疾病相关模式的提取,从而助力新型诊断标志物和潜在治疗靶点的发现¹⁷⁾。

5.2 诊断与治疗的发展前景

在诊断领域,仅依赖单一生物标志物难以满足临床需求,开发整合多种EVs来源分子的诊断组合将至关重要。另一项核心挑战是实现基于患者特异性EVs谱的个性化诊断与治疗策略。未来,EVs分析有望从中心化实验室检测扩展至临床场景的实时诊断,甚至进一步延伸至去中心化检测或居家检测场景。

在治疗领域,整合了基因工程与化学、物理工程方法的EVs工程化技术不断发展,有望推动靶向特异性、疗效及稳定性均得到提升的下一代治疗性EVs的研发。尤其重要的是,已有研究证实某些EVs群体可进入中枢神经系统,这一特性或将为神经退行性疾病及其他传统治疗方式难以攻克的疾病开辟新的治疗途径。在监管层面,2023年日本药品和医疗器械管理局(PMDA)通过其科学委员会外泌体专家小组委员会发布了一份报告,明确了保障EVs类治疗产品质量与安全性、推动其临床转化的关键考量因素¹⁸⁾。该举措是全球范围内针对EVs类药物最早的监管举措之一,也成为EVs药物开发领域中的重要里程碑。

5.3 产业与社会影响及现存挑战

EVs产业有望在诊断和治疗两大领域形成数百亿美元规模的市场,并成为新兴生物经济的重要支柱。但要实现EVs技术的广泛临床应用与产业化应用,仍需克服若干挑战:包括建立与MISEV 2023接轨、国际统一的标准化和监管框架,开发适用于临床的EVs规模化制备及长期保存技术,以及通过大规模临床试验积累充分的有效性和安全性证据。

PS亲和法兼具高可重复性和易于质量控制的特点,是攻克上述挑战的理想技术基础,有望在基于EVs的药物的研发与产业化进程中发挥重要作用,助力将EVs相关研究成果转化为切实的临床和社会价值。

6. 总结

细胞外囊泡(EVs)研究具有极高的学术价值与应用潜力,有望从基础生命科学到医学应用的多个领域推动创新突破。近年来,国际指南的逐步完善构建了坚实的研究框架,使EV研究从实验设计、分离纯化、分析检测到结果报告的全流程在可重复性与透明度方面均得到显著提升。与此同时,随着标准化工作的持续推进,包括PS亲和法在内的创新分析技术不断涌现,为EVs的精准表征与功能探究提供了有力支撑,进而加速了其向诊断与治疗应用的转化进程。

未来十年,基于EV分析的液体活检技术有望成为临床标准检测手段,而EV疗法预计将在多个疾病领域获得监管批准并实现商业化。这些发展或将推动个体化医疗的发展、降低医疗成本,并延长人类健康预期寿命。

PS亲和法作为基于生理机制的高特异性分离与检测技术,有望持续优化并得到更广泛的应用。因此,该技术有望成为支撑EV研究与药物开发的基础技术之一,随着EV科学的不断发展及向社会效益的转化,其影响力将与日俱增。

参考文献

- 1) Valadi, H. et al.: *Nat. Cell Biol.*, **9**(6), 654(2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells
- 2) Welsh, J. A. et al.: *J. Extracell. Vesicles*, **13**(2), e12404(2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches
- 3) Tóth, E. Á. et al.: *J. Extracell. Vesicles*, **10**(11), e12140(2021). Formation of a protein corona on the surface of extracellular vesicles in blood plasma
- 4) Tamura, T. et al.: *Extracell. Vesicles Circ. Nucl. Acids*, **2**(2), 148(2021). Extracellular vesicles as a promising biomarker resource in liquid biopsy for cancer
- 5) Park, C. et al.: *Front. Neurosci.*, **18**, 1426700(2024). CNS cell-derived exosome signatures as blood-based biomarkers of neurodegenerative diseases
- 6) Chen, T. et al.: *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **13**, 1600227(2025). Extracellular vesicles as vital players in drug delivery: a focus on clinical disease treatment
- 7) Xu, G. et al.: *Signal Transduct. Targeted Ther.*, **10**(1), 255(2025). Extracellular vesicle-based drug overview: research landscape, quality control and nonclinical evaluation strategies
- 8) Figueroa-Valdés, A. I. et al.: *J. Nanobiotechnology*, **23**(1), 13(2025). Clinical-grade extracellular vesicles derived from umbilical cord mesenchymal stromal cells: preclinical development and first-in human intra-articular validation as therapeutics for knee osteoarthritis
- 9) Wang, Y. et al.: *J. Tissue Eng.*, **16**, 20417314251319474(2025). Extracellular vesicles: From large-scale production and engineering to clinical applications
- 10) Jafari, D. et al.: *BioDrugs*, **34**(5), 567(2020). Designer Exosomes: A New Platform for Biotechnology Therapeutics
- 11) Lyu, X. et al.: *J. Extracell. Vesicles*, **14**(4), e70035(2025). Direct delivery of immune modulators to tumour-infiltrating lymphocytes using engineered extracellular vesicles
- 12) Nakai, W. et al.: *Sci. Rep.*, **6**, 33935(2016). A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles
- 13) Matsumoto, A. et al.: *iScience*, **24**(8), 102839(2021). Phosphatidylserine-deficient small extracellular vesicle is a major somatic cell-derived sEV subpopulation in blood
- 14) Takahashi, Y. et al.: *Anal. Chem.*, **95**(34), 12664(2023). Nanopipette Fabrication Guidelines for SICM Nanoscale Imaging
- 15) Kobayashi, H. et al.: *Sci. Rep.*, **14**(1), 7465(2024). Precise analysis of single small extracellular vesicles using flow cytometry
- 16) Muraoka, S. et al.: *ACS Omega*, **7**(45), 41472(2022). Automated Proteomics Sample Preparation of Phosphatidylserine-Positive Extracellular Vesicles from Human Body Fluids
- 17) García-Barberán, V. et al.: *Extracell. Vesicles Circ. Nucl. Acids*, **6**(1), 128(2025). The times they are a-changing: AI-powered advances in the application of extracellular vesicles to liquid biopsy in breast cancer
- 18) Takakura, Y. et al.: *Pharm. Res.*, **41**(8), 1573(2024). Quality and Safety Considerations for Therapeutic Products Based on Extracellular Vesicles

细胞外囊泡分离与纯化技术的挑战

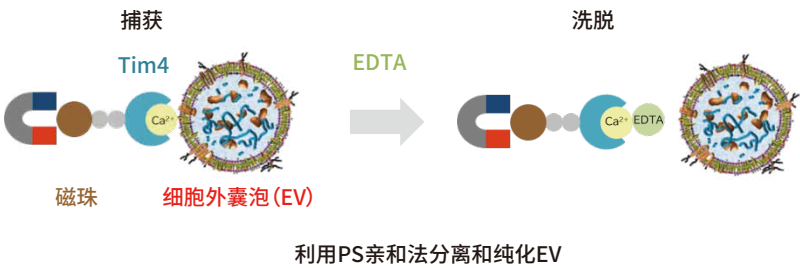
细胞外囊泡 (EV: Extracellular Vesicle) 是由多种类型的细胞释放的纳米级膜囊泡。因含 mRNA、microRNA (miRNA) 等核酸和蛋白质, 使其具有向其他细胞传递信息的功能。外泌体作为细胞间信号传导的通讯工具和癌症等各种疾病的生物标志物而备受关注¹⁻²⁾。因此, 这几年各领域广泛展开外泌体相关的研究, 然而, 目前用于外泌体研究的实验技术依旧处于开发阶段, 许多问题仍有待改进。

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挑战的, 由 FUJIFILM Wako 全新开发的新型外泌体分析工具。

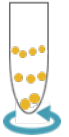
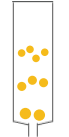
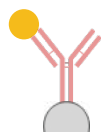
使用磷脂酰丝氨酸和Tim4的细胞外囊泡分离和纯化方法

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, 在钙离子存在下捕获培养上清和血清等样品中的外泌体, 并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。此外, 该方法作为EV分离法之一被纳入了2024年发布的国际EV研究指南《MISEV2023》⁶⁾。



EV分离和纯化方法的比较

	超速离心法	密度梯度离心法	尺寸排阻色谱法	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EVs沉淀	 添加蔗糖后进行离心, 根据沉降速度进行划分	 通过凝胶过滤, 根据大小分离EVs	 通过PEG等聚合物使EVs沉淀	 使用针对EVs表面抗原的抗体捕获EVs	 通过与EV表面的PS结合Tim4捕获EVs
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

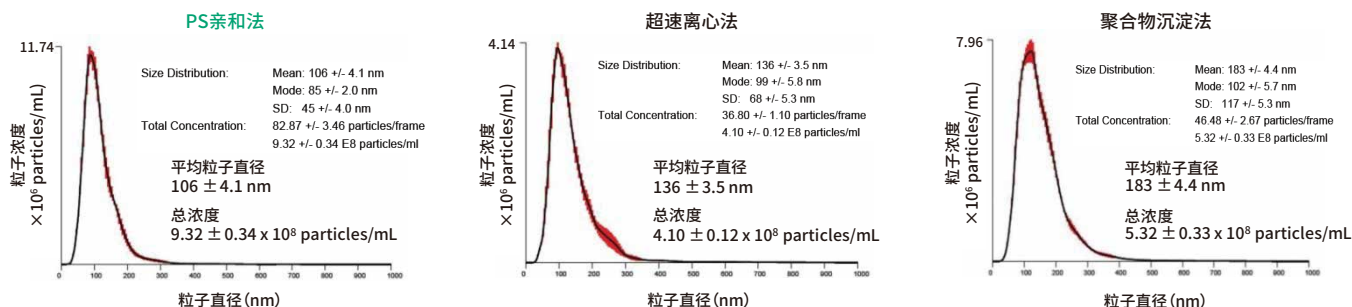
1) Tkach, M. et al.: *Cell*, **164**, 1226(2016).
2) Raimondo, F. et al.: *Proteomics*, **11**, 709(2011).
3) Trajkovic, K. et al.: *Science*, **319** (5867), 1244(2008).
4) Miyanishi, M. et al.: *Nature*, **450** (7168), 435(2007).
5) Nakai, W., et al.: *Sci. rep.*, **6**(1), 1(2016).
6) Welsh, J. A. et al.: *J. Extracell. Vesicles*, **13**(2), e12404(2024).

PS亲和法的性能数据

使用NanoSight分析粒子

NanoSight是通过NTA (Nano 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¹⁾。



【结果】

与其他方法相比, PS亲和法的粒子浓度更高、粒径分布更清晰。高纯率的EV分离有助于更准确地了解样品中EV的整体特征。

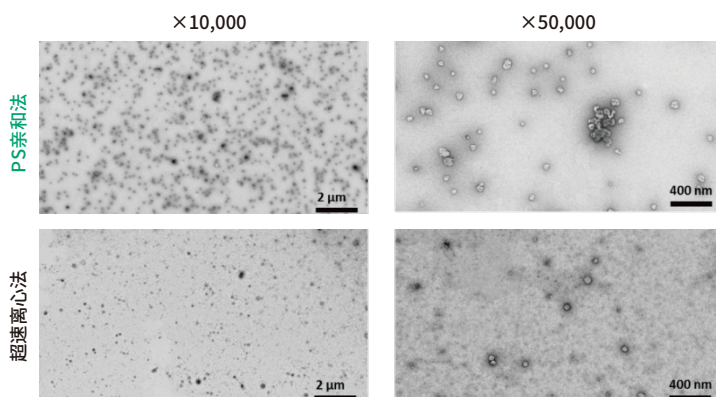
使用电子显微镜分析粒子

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。使用不同的方法从10 mL COLO201细胞的细胞培养上清中分离纯化EV, 并使用透射电子显微镜 (TEM) 进行分析。

<参考>粒子浓度 (NTA)

PS亲和法: 3.69 × 10¹⁰ particles/mL

超速离心法: 1.68 × 10¹⁰ particles/mL



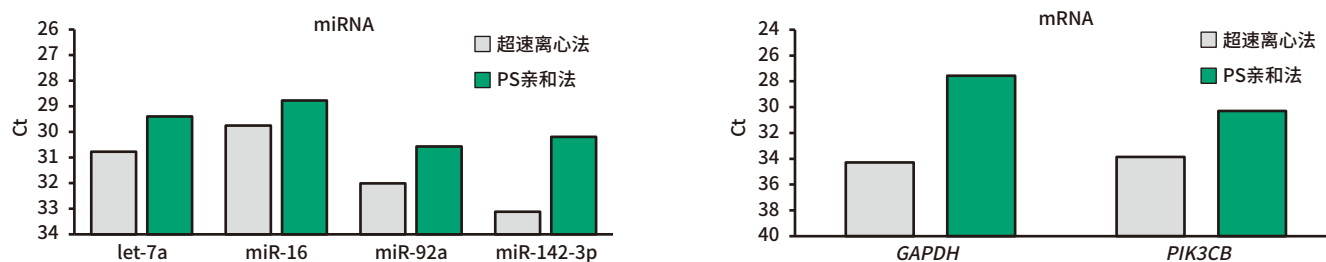
<照片数据提供> 花市电子显微技术研究所

【结果】

与超速离心法相比, PS亲和法分离纯化的EVs纯度更高, 污染更少。PS亲和法有助于分离高纯度的EV, 并最大限度地减少杂质对实验结果的影响。

qPCR法检测microRNA和mRNA的回收量

通过超速离心法和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。

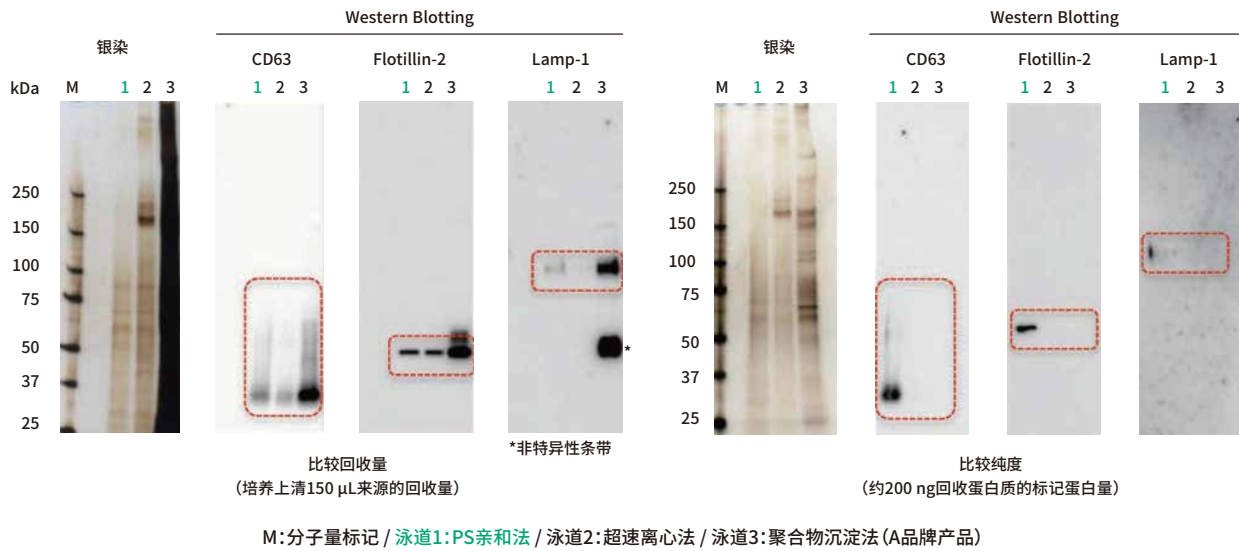


【结果】

与超速离心法相比, PS亲和法分离纯化的EV可回收到更多的microRNA和mRNA。RNA产量的增加有望提高生物标志物发现及其他应用中的检测灵敏度。

EV标记蛋白的回收量和纯度

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。

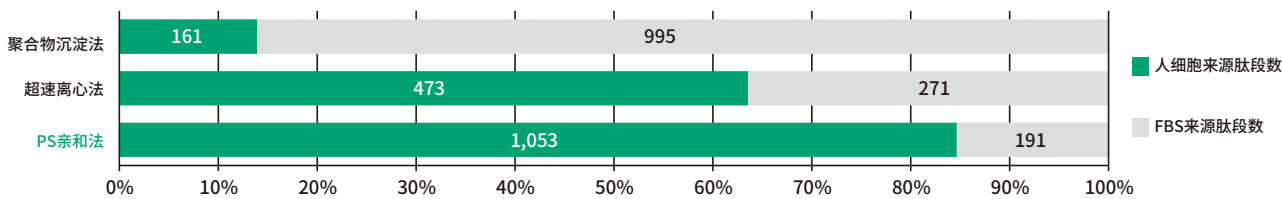


【结果】

PS亲和法可获得更高纯度的EV, 每个样品中的EV标志物含量较少, 但每个蛋白中的EV标志物含量更高。

质谱法分析FBS来源肽段的污染

使用PS亲和法、超速离心法、聚合物沉淀法从K562细胞的细胞培养上清(添加10%去外泌体FBS的培养基)中分离和纯化样本, 并使用质谱法(MS)分析, 比较所有鉴定出的肽段中来源于K562细胞的人源肽段与FBS来源肽段的比例。



【结果】

与超速离心法和聚合物沉淀法相比, PS亲和法可回收更高纯度EV, 且FBS来源肽段的比例更低。PS亲和法能够抑制FBS来源肽段的影响, 从而更准确地了解EVs的作用。

【专栏】

不能仅凭蛋白总量计算外泌体回收量的原因

比较EV回收量时, 一般会检测粒子数、总蛋白量等参数。需要注意的是, 这两种方法均可能受到原始样品中污染物的影响, 导致EV数量被高估。

基于BCA法测定的总蛋白含量(表1)、通过NTA计数的粒子数(表2)以及通过ELISA评估的外泌体标志物(CD9、CD63和CD81)信号水平(图1), 比较超速离心法(UC)和PS亲和法(PS)纯化后的EV产量。结果显示, 使用PS亲和法纯化的样品回收了更多的外泌体。

由于总蛋白含量包含杂质, 因此不能准确反映实际的EV数量。根据MISEV2023指南, EV标志蛋白水平是评估EV数量的重要指标。

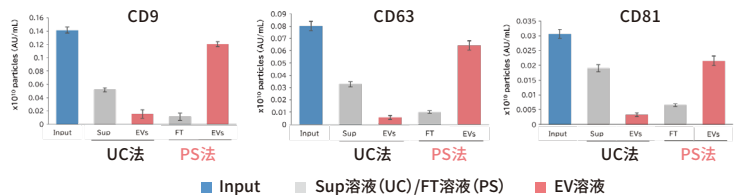
表1 通过BCA法比较总蛋白量

	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NTA法比较粒子数

	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



蛋白质组学分析

分别使用PS亲和法、超速离心法和聚合物沉淀法，从K562细胞培养上清（含10%去外泌体FBS添加培养基）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⁾。

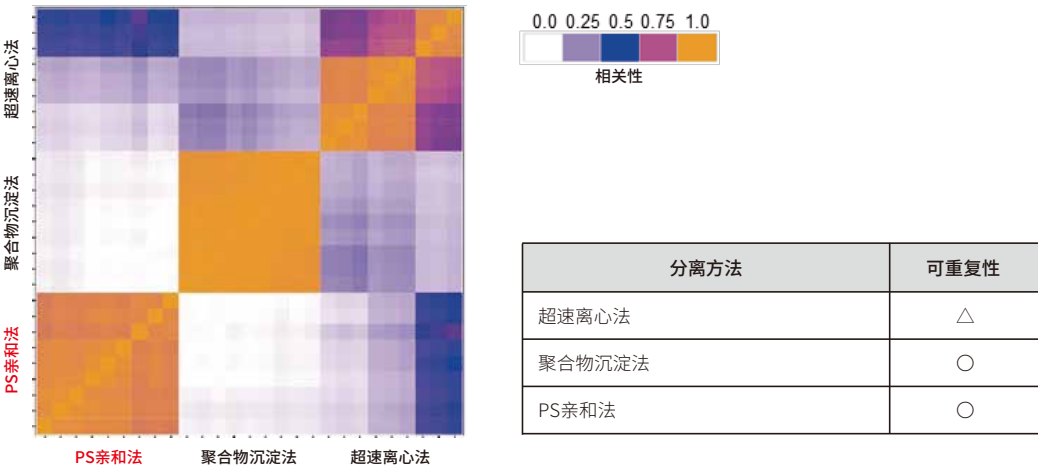
鉴定的蛋白含量前10的蛋白

	EV标记蛋白	EV来源人蛋白	FBS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	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】

与超速离心法和聚合物沉淀法相比，PS亲和法纯化的EV中，鉴定出的蛋白质中，EV标志蛋白的比例更高。这一结果表明，PS亲和法能够降低杂质引起的噪声，并能更准确地检测EVs来源的生物标志物。

成对相关性比较



【结果】

与超速离心法相比，PS亲和法和聚合物沉淀法展现出更优异的可重复性。更优的可重复性有助于在有限的样本和实验次数下获得准确的数据。

参考文献

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

PS亲和法的优点与常见问题

*文章撰写于2022年

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。与使用传统抗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。

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。

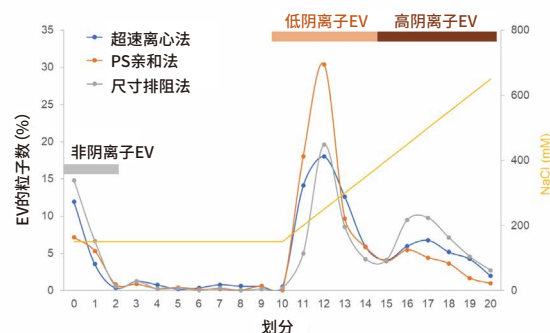


图1 各种EV纯化法纯化的EV亚群比较

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研究的分析方法多样, 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。

顶尖细胞外囊泡研究者见解

PS亲和法的优势

PS亲和法被广泛应用于细胞外囊泡 (EVs) 的分离与纯化, 可在保证囊泡完整性的前提下, 实现高纯度与高回收率。在本系列中, 处于EVs研究前沿的顶尖研究者们将分享他们对PS亲和法优势的见解, 以及该方法在其研究工作中所发挥的作用。

植田 幸嗣 博士

癌症精准医疗研究中心 分析生物化学研究部
部长

近年来, 针对细胞外囊泡 (EVs) 的研究日益增多, 不仅深化了对其生物学功能的理解, 也使其作为诊断和治疗工具的应用潜力备受关注。事实上, 以EVs包裹蛋白为检测靶标的液体活检技术, 以及基于间充质干细胞来源EVs的治疗应用, 正逐步走向临床应用阶段。

所有EV相关研究共同面临的关键问题, 在于所分析EVs制备物的纯度。例如, 通过循环EVs的组学分析寻找生物标志物时, 或是将MSC来源EVs用于动物或人体治疗时, 分离所得EVs的纯度会对研究结果产生深远影响。

基于我们独创的EV纯度评估方法——EV富集评分 (EES, EV Enrichment Score) (该方法利用深度蛋白质组学分析), 我们已证实: MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS系列与超速离心法及其他常规分离技术相比, 可获得纯度极高的EVs (EES数据参见后文)。尤其当MagCapture™ EV分离试剂盒PS for HTS与自动化磁珠处理设备联用时, 可在半天内连续完成96份样本的EVs纯化, 甚至包括后续LC/MS分析所需的胰蛋白酶消化。因此, 该实验流程已成为我们开展大样本队列的癌症与失智症诊断研发工作中不可或缺的工具, 在数据质量与分析通量上均具备显著优势。

村冈 贤 博士

日本国立生物医学创新、健康与营养研究所药物设计研究中心
高级研究员

细胞外囊泡 (Extracellular Vesicles; EVs) 是细胞分泌的膜结合囊泡, 包裹着蛋白质、RNA、代谢物等多种生物分子。在脂质双层膜的保护下, EVs在血液等生物体液中稳定存在, 作为可反映来源组织的生理与病理状态的生物标志物备受关注。此外, EVs在细胞间通讯中发挥关键作用, 可用于监测疾病进展与治疗效果, 在基础研究与临床应用中均被寄予厚望。

EVs纯化与分离方法的选择会对研究结果质量产生显著影响, 因此必须谨慎选择。目前已报道了多种分离方法, 包括超速离心、密度梯度离心、沉淀法、尺寸排阻色谱、亲和分离法以及基于微流控芯片的技术等。各类方法均有其优缺点, 而PS亲和法在本人的研究中展现出尤为突出的实用价值。

尽管该方法的回收率略低于其他方法, 但其特异性极高, 能够以最少的背景污染物富集目标囊泡。本人主要开展EVs蛋白质组分析, 而该方法可最大限度降低污染, 使得鉴定出真正来源于EVs的蛋白质群体成为可能, 是不可或缺的技术手段。

此外, 临床研究中往往需要一次性处理数百份样本。通过将该方法与KingFisher、Bravo等自动化平台联用, 我们建立了高通量、高重复性的实验流程, 在获得可靠数据的同时大幅节省了时间。因此, PS亲和法已成为推动本人研究工作的核心技术。

阿部 宽幸 博士

新潟大学医学与牙科研究生院消化内科与肝病科
特聘副教授

在新潟大学, 我们正积极开展针对肝硬化的再生医学研究。利用人源MSC进行的肝脏再生疗法已从基础研究逐步迈向临床应用。在该项转化研究中, MSC来源EVs备受关注。EVs被巨噬细胞摄取后, 可促进巨噬细胞向抗炎表型极化, 进而发挥抗炎与抗纤维化作用。面向未来临床应用, 亟需能够从大规模MSC培养上清中稳定、高效地分离出高生物活性EVs的技术。PS亲和法以EVs表面的PS为靶点, 可实现高纯度EVs的分离。PS是巨噬细胞的“eat-me”信号, 该技术有望选择性分离出高生物活性的EVs。该方法同样适用于基于柱系统的大规模提取, 在临床应用中极具前景。另一方面, 商品化试剂盒操作简便, 适用于小规模研究与分析。我们采用PS亲和法从MSC培养上清中分离EVs, 并在肝硬化小鼠模型中评估其质量与治疗效果。组织学分析显示, 该方法在纤维化改善方面与其他方法效果相当; 而生化分析则表明, 该方法在对肝功能有更显著的改善。综上, PS亲和法可在实现EVs大规模分离的同时提升治疗效果, 是一项具有临床应用价值的技术。

笔者所属机构、职位、以及本系列文章内容均基于发布时的现有信息。文章不对所述产品性能提供保证。

PS亲和法助力全球科研

应用PS亲和法的研究文献

地区	所属机构	标题	期刊	年份
US	Department of Environmental Health, Harvard T.H. Chan School of Public Health	Mechanical Compression of Human Airway Epithelial Cells Induces Release of Extracellular Vesicles Containing Tenascin C	Cells	2023
US	Laboratory of Host-Pathogen Dynamics, National Heart Lung and Blood Institute, National Institutes of Health	Enteric viruses replicate in salivary glands and infect through saliva	Nature	2022
US	Department of Bioengineering, University of Pennsylvania	Modeling and optimization of parallelized immunomagnetic nanopore sorting for surface marker specific isolation of extracellular vesicles from complex media	Scientific reports	2023
US	Department of Physiology & Biomedical Engineering, Mayo Clinic	An Integrated Digital Microfluidic Device for the Extraction and Detection of Extracellular Vesicle-Based Molecules	Small	2025
EU	Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University	Glutamine and serum starvation alters the ATP production, oxidative stress, and abundance of mitochondrial RNAs in extracellular vesicles produced by cancer cells	Scientific reports	2024
EU	Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences	Negative Charge-Carrying Glycans Attached to Exosomes as Novel Liquid Biopsy Marker	Sensors	2024
EU	Fondazione "Enrico Puccinelli" Onlus	A Comparative Review of the Detection of Early-stage Lung Cancer by Exosomal and Free Nucleic Acids and Standard Screening Methods	Cancer Screening and Prevention	2023
EU	Institute of Solid State Physics, University of Latvia	Elucidating Extracellular Vesicle Isolation Kinetics via an Integrated Off-Stoichiometry Thiol-Ene and Cyclic Olefin Copolymer Microfluidic Device	Polymers (Basel)	2024
CN	Department of Cardiology, Xuanwu Hospital, Capital Medical University	Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells prevent cardiomyocyte apoptosis induced by oxidative stress	Cell Death Discovery	2019
CN	Department of Chemistry, Zhejiang University	Rapid enrichment and sensitive detection of extracellular vesicles through measuring the phospholipids and transmembrane protein in a microfluidic chip	Biosensors and Bioelectronics	2022
CN	Department of Nephrology, Zhejiang Provincial People's Hospital	Exosomal miRNA-215-5p Derived from Adipose-Derived Stem Cells Attenuates Epithelial-Mesenchymal Transition of Podocytes by Inhibiting ZEB2.	BioMed Research International	2020
CN	Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, The Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University	CircANTXR1 Contributes to the Malignant Progression of Hepatocellular Carcinoma by Promoting Proliferation and Metastasis	Journal of Hepatocellular Carcinoma	2021
AP	Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, and Cholangiocarcinoma Research Institute, Khon Kaen University	Cholangiocarcinoma-derived secreted products and growth arrest-specific 2-like 3 enhance migratory and invasive abilities of fibroblasts	European Journal of Cell Biology	2025
AP	Department of Orthopedics, Kaohsiung Medical University Hospital	Effect of lyophilized exosomes derived from umbilical cord stem cells on chronic anterior cruciate ligament cell injury	Journal of Orthopaedic Surgery and Research International	2024
JP	Neuroscience Drug Discovery Unit, Takeda Pharmaceutical Company Limited	Analysis of Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles by Proximity Extension Assay: A Comparative Study of Four Isolation Kits	Journal of Molecular Sciences	2020
JP	Laboratory of Proteome Research, National Institute of Biomedical Innovation, Health and Nutrition	Comprehensive proteomic profiling of plasma and serum phosphatidylserine-positive extracellular vesicles reveals tissue-specific proteins	Cell Press	2022
JP	Department of Innovative Medical Science, Tokai University School of Medicine	Secreted phospholipase A2 modifies extracellular vesicles and accelerates B cell lymphoma	Cell Metabolism	2022
JP	Division of Oral Rehabilitation, Department of Periodontology, Faculty of Dental Science, Kyushu University	Extracellular vesicles derived from GMSCs stimulated with TNF-α and IFN-α promote M2 macrophage polarization via enhanced CD73 and CD5L expression	Scientific reports	2022
JP	Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo	Urinary extracellular vesicles signature for diagnosis of kidney disease	iScience	2022

基于磁珠法和PS亲和法的EV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

- 与传统超速离心法相比, 可获得更高纯度、更高回收量的EVs
- 可获得完整的EVs, 应用广泛
- 磁珠法操作简便, 可处理多个样本, 且重复性高



操作简单, 仅需3小时即可完成, 节省您的时间! 此外, 更高的纯度使其成为生物标志物发现与功能分析的理想选择!

原理



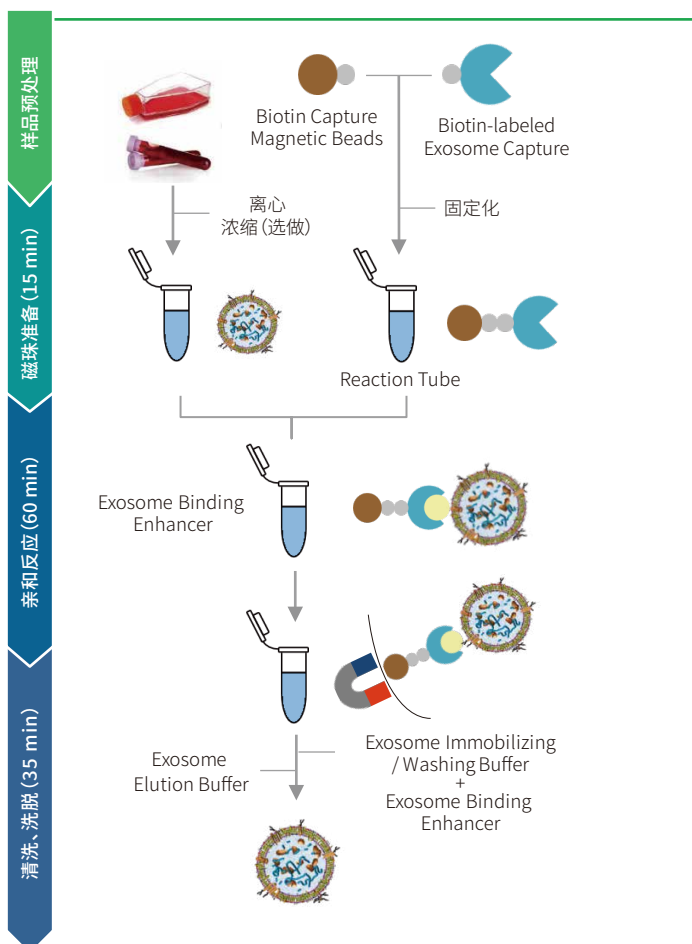
样品

- 细胞培养上清液
- 血清
- 唾液等
- 血浆
- 尿液

最大回收量 (仅供参考)

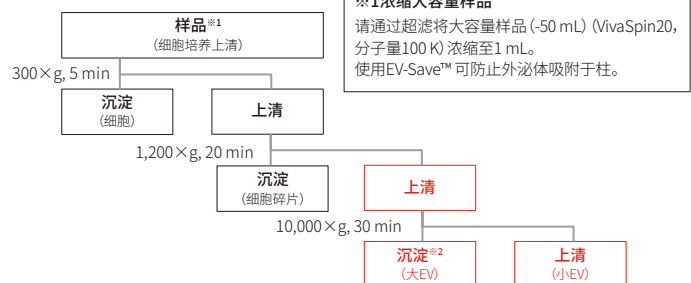
单次纯化过程的最大产量约为 $1-5 \times 10^{10}$ particles。即使样本量超过最大产量, 重复分离仍可提高EV产量。

实验流程



样品预处理流程

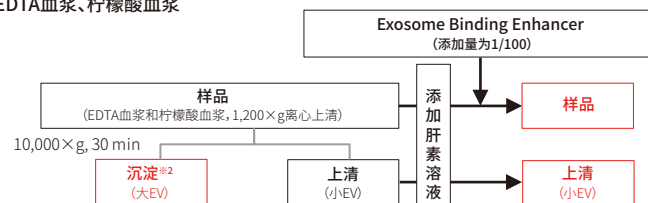
▼ 细胞培养上清



▼ 血清、肝素血浆、尿液、唾液



▼ EDTA血浆、柠檬酸血浆



※2 获得大EV
通过离心分离 (10,000xg, 30 min) 获得的沉淀经TBS悬浮后, 可作为样品使用。

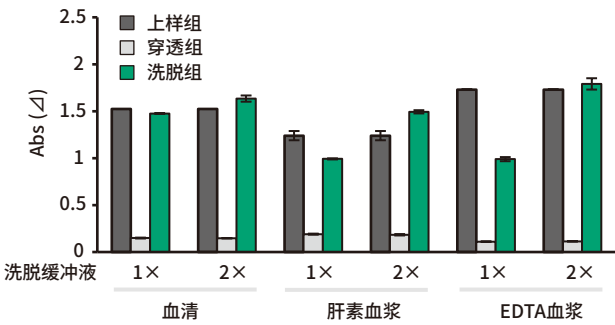
数据

▼ 从人血清以及血浆样本中分离纯化EV

使用本产品从多种人血液样本中分离纯化EVs。使用PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP) 检测EVs回收率。评估两种不同浓度 (1×和2×) 的洗脱缓冲液。

【结果】

使用本产品可从人血清和血浆样本中高效回收EVs。尤其在使用高浓度 (2×) 洗脱缓冲液时, 血浆样本的回收率显著提升。

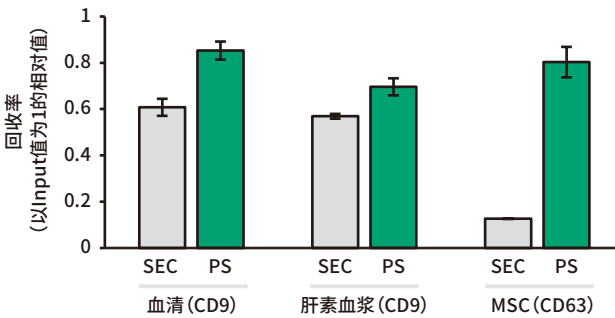


▼ 与尺寸排阻色谱法的回收率对比

使用尺寸排阻色谱法 (SEC) 或本产品 (PS), 从人血清、肝素血浆以及骨髓来源间充质干细胞 (MSC) 的培养上清中分离纯化EVs。使用CD9-Capture或CD63-Capture人外泌体ELISA 试剂盒 (链霉亲和素HRP) 检测EV产量。

【结果】

与SEC相比, 本产品的EV回收率更高。



▼ 蛋白质组学分析比较人血浆来源EV中鉴定的蛋白数量及EV富集分数

使用各方法从200 μL人血浆中分离EV, 使用FAIMS Pro的LC/MS Orbitrap Fusion Lumos进行蛋白质组学分析 (DIA, 120 min)。通过比较鉴定出的EV标志物蛋白占总鉴定蛋白的比例, 评估EV纯度 (EES: EV Enrichment Score, EV富集分数公式如下)。

EV富集分数 (%)

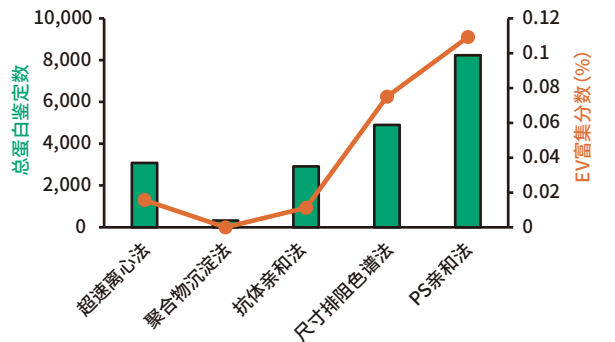
EV标志物的总蛋白丰度

所有鉴定蛋白质的总蛋白丰度

× 100

【结果】

与其他方法相比, 本产品的蛋白质鉴定数更高, 而且EES更高, 表明通过分离可获得高纯度EV。本产品非常适合用于血液样本中EV来源蛋白生物标志物发现。



数据由日本癌症研究会癌症精准医学中心分析生物化学部的植田幸嗣教授提供。

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

相关产品

磁力架

本产品是一款专为磁珠分离设计的磁性支架。可配合磁珠法使用, 例如MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver.2。最多可同时处理16个微管 (1.5 mL或2.0 mL)。配备强力磁石, 可短时间内捕获微小磁珠, 减少等待时间, 提高效率。



产品编号	产品名称	规格
299-36421	MAGNET STAND	1 pcs

适用于自动提取设备的高通量EVs分离与纯化

MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS

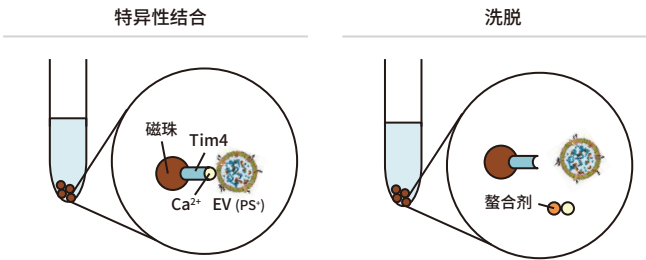
MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS是使用PS亲和法分离和纯化细胞外囊泡 (EV) 的试剂盒, 适用于自动提取设备。由于可从多达96份样品中分离和纯化EV, 因此也适用于利用EV进行生物标记的探索和高通量筛选 (HTS)。

特点

- 配合自动提取设备, 可同时从多至96个样品中分离和纯化EV
- 使用自行研发的分离纯化技术“PS亲和法”, 可分离高纯度且低损伤的EV。

当与KingFisher™ 配合使用时, 可在1小时内快速完成从96个样本中纯化EV, 因此非常适用于生物标志物的发现研究!

原理



兼容的自动提取设备

全自动提取设备	适用样本	最大处理样本数	样本体积
KingFisher™ Flex (赛默飞世尔科技)	细胞培养上清液/血清/血浆/尿液	96 (96深孔板)	≤1 mL
		24 (24深孔板)	1-5 mL

与手动试剂盒对比

与手动分离和纯化用试剂盒MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (产品编号: 290-84103) 相比, 两者的区别如下表所示。请注意, 我们的EV回收效率相当 (详情请参考“数据”)。

	自动提取 (MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS)	手动提取 (MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2)
Tim4与磁珠的结合方法	预先结合 Tim4已直接预先结合在磁珠上, 无需再进行单独的结合步骤。	亲和素-生物素介导 Tim4通过亲和素-生物素相互作用与磁珠结合, 需要与Tim4结合的步骤。
洗脱缓冲液中表面活性剂浓度	高 (抑制了磁珠的损耗)	低
洗脱缓冲液中EDTA浓度	高 (减少了洗脱步骤的次数)	低

实验流程 (适用于KingFisher™ Flex)

样本前处理 (手动)

配置缓冲液 (手动)

孔板制备 (手动)

分离EV (自动)

样本前处理

离心分离样品, 使杂质沉淀, 收集上清液。

配置缓冲液

分别配置EV Washing Buffer (1×) 以及EV Elution Buffer (1×)。

配置样品

在1.5 mL微管中分装样品, 并添加EV Binding Enhancer。

孔板制备

制备7种不同类型的孔板。

启动设备和程序

启动KingFisher™ Flex并选择预设Protocol。

启动处理程序

孔板和枪头放置至指定位置, 启动处理程序。

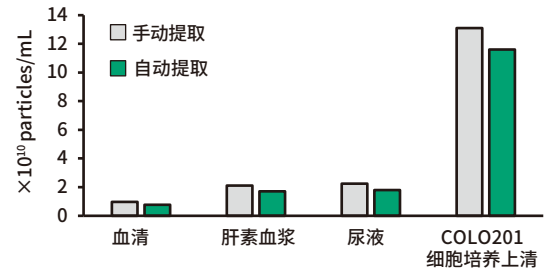
回收孔板和枪头

从设备中回收孔板与枪头, 分离出的EV溶液位于特定板中。

数据

▼通过NTA比较手动试剂盒与KingFisher™ Flex的粒子数

使用MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS (Auto, 自动提取) 和MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (Manual, 手动提取), 从血清、肝素血浆、尿液、细胞培养上清 (COLO201) 中分离和纯化EV。通过纳米颗粒追踪分析 (NTA) 确认EV的粒子数。

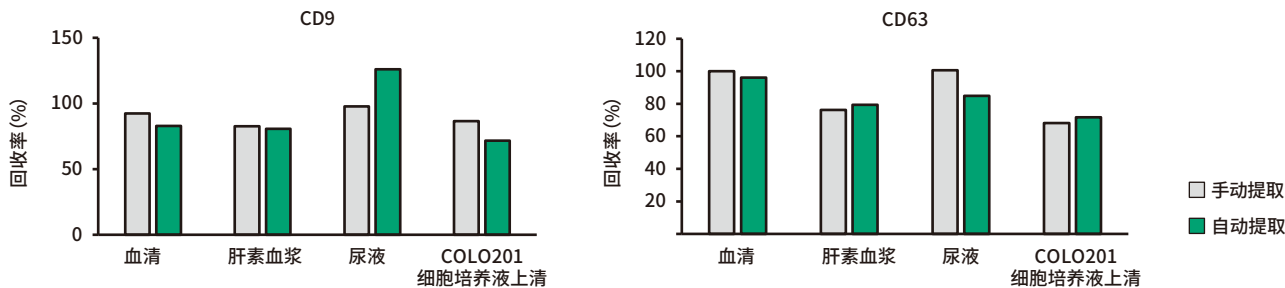


【结果】

MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS和手动试剂盒获得了相同程度的粒子数。

▼通过ELISA比较分离的粒子数 (KingFisher™ Flex)

使用MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS (自动提取) 和MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (手动提取), 从血清、肝素血浆、尿液、细胞培养上清 (COLO201) 中分离和纯化EV。然后使用PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP) (产品编号: 298-80601) 确认EV的回收率。



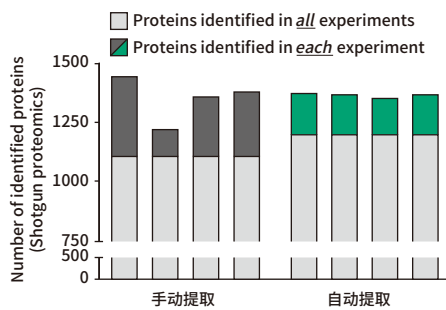
【结果】

使用MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS和手动试剂盒获得了相同程度的回收率。

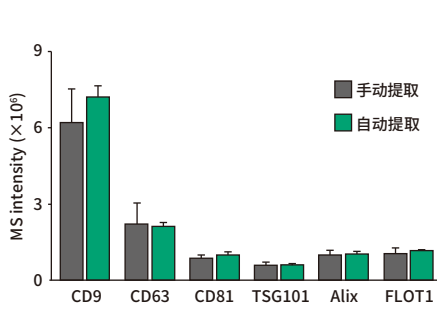
▼通过蛋白质组学分析, 比较分离的蛋白质种类、蛋白量 (KingFisher™ Flex)

使用MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS (自动提取) 和MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (手动提取) 从200 μ L人血清中分离和纯化EV。蛋白质组学分析回收的EV溶液。

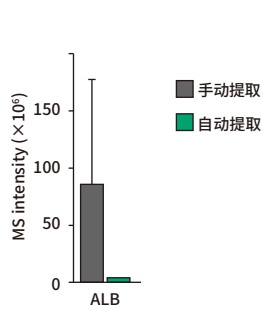
(1) 鉴定的蛋白质种类



(2) EV标记蛋白质的量



(3) 非EV标记的量 (以白蛋白为例)



【结果】

在4次实验中, MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS与手动试剂盒相比, 鉴定的蛋白质数量始终更多、再现性更高。

【结果】

使用MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS和手动试剂盒进行分离的EV中所含的EV标记蛋白质之间并无显著差异, 自动化对EV的回收率没有影响。

【结果】

与手动试剂盒相比, 使用MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS纯化分离的非EV标志物白蛋白量更少, 表明其回收的EV纯度高。

产品编号	产品名称	等级	规格
293-96401	MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS	基因研究用	96 tests

用于从大规格细胞培养上清液中分离和纯化EV

MassivEV™ EV纯化分离柱PS

MassivEV™ EV Purification Column PS是用于从大规格细胞培养上清中分离和纯化细胞外囊泡 (EV) 的分离柱。通过PS亲和法并配合专用的MassivEV™ EV纯化缓冲液套装 (另售)，可简易纯化高纯度EV。

生产级产品现已上市

FUJIFILM Wako可提供生产级别 (已完成内毒素检测与无菌检测) 的产品。详情请咨询客服。



特点

- 可从大规格 (10 mL至公升级别规格) 细胞培养上清液中高效分离和纯化高纯度EV
- 无需切向流过滤 (TFF) 系统等昂贵设备 ※只需一个蠕动泵



该产品可实现大规模纯化高纯度、高活性EVs, 非常适用于开发EV药物和化妆品

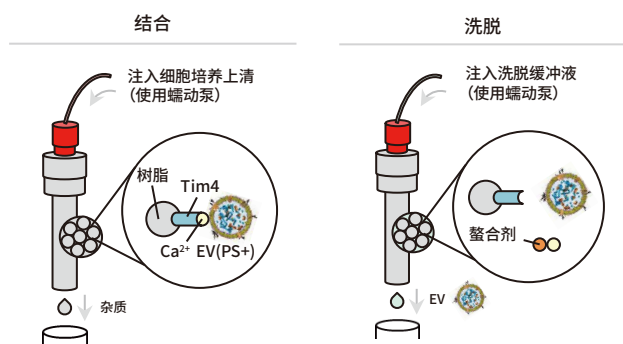
表1 从200 mL间充质干细胞培养上清中分离和纯化EV的对比 (FUJIFILM Wako评估)

	MassivEV™	TFF+ AEX [※]	TFF+ SEC [※]
可纯化的EV	PS阳性EV	取决于样品	取决于样品
纯度	高	低	低
纯化步骤数	1个步骤 - PS亲和法	2个步骤 - TFF系统 - 阴离子交换色谱法	2个步骤 - TFF系统 - 尺寸排阻色谱法
EV粒子产量 (参考值)	1.7×10^{11} particles	1.1×10^{11} particles	0.7×10^{11} particles
纯化所需时间	8 h (可选择缩短时间; 约5 h)	10 h	10 h

<参考> 一只小鼠的EV建议给药量: 1.0×10^9 particles/mouse

※AEX: 阴离子交换色谱法; SEC: 尺寸排阻色谱法

原理



样品

细胞培养上清液 (MSC等): 10 mL至公升级别规格

注意: 当从10 mL及以下体积的细胞培养上清液中分离EVs时, 请使用MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2。

处理样品量

	1 mL (产品编号: 131-19491)	5 mL (产品编号: 137-19493)
样品量 ^{※1}	200 mL	1 L
洗脱体积	4 mL	20 mL
动态结合能力 ^{※2}	5×10^{11} particles/mL树脂	2.5×10^{12} particles/5 mL树脂

※1 MSC细胞培养上清中一次纯化可处理的大概样品量。样品处理量因细胞培养上清中所含的EV粒子数而异。处理同一样品时, 可重复使用分离柱, 已确认最多可使用5次 (初次使用1次、重复使用4次)。

※2 使用MSC来源EV的研究结果。可能因细胞种类等条件而异。

实验流程 (适用于KingFisher™ Flex)

细胞培养	样品准备 (>2 h)	分离柱处理 (> (4-7 h))	置换缓冲液 (30 min-1 h)
细胞培养 培养目的细胞, 促进细胞增殖和EV产生, 回收细胞培养上清液。	样品准备 向细胞培养上清液中添加EV Binding Enhancer。 细胞培养上清液前处理 通过离心分离或过滤去除杂质。 脱气 加热细胞培养上清液至室温以上 (25-28°C), 然后使用过滤器过滤。	清洗1 将分离柱恢复至室温, 注入Washing Buffer。 样品反应 将细胞培养上清液注入分离柱, 使EV上的PS和树脂上的Tim4发生反应。 清洗2 将EV Binding Enhancer/Washing Buffer注入分离柱, 清洗树脂。 洗脱 使用EV Elution/EV-Stabilizer Buffer更换分离柱内50%的EV Binding Enhancer/Washing Buffer。然后组装EV回收管, 收集EVs (也可将EVs保存在分离柱中)。	置换缓冲液 使用凝胶过滤或尺寸排阻过滤法置换缓冲液。

数据

▼ 对比传统方法

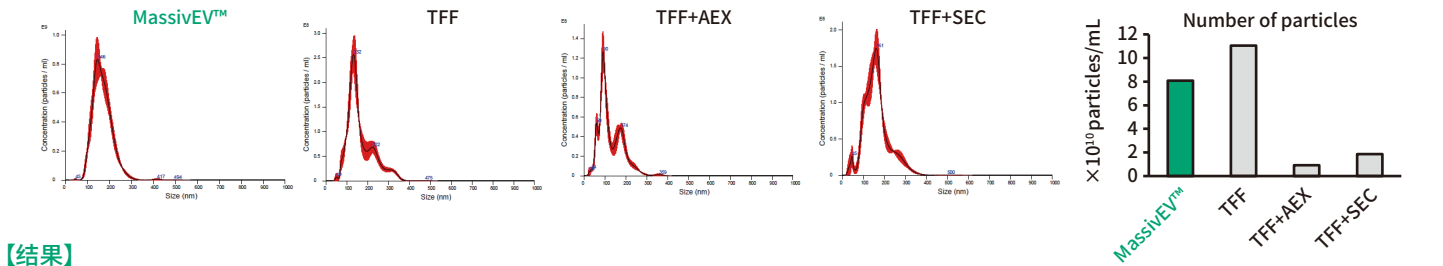
在增殖培养基 (MSCulture™/10% FBS) 及EV生产培养基 (EV-Up™) 中培养骨髓来源的MSC, 回收细胞培养上清后, 使用0.22 μm过滤器过滤。取200 mL经过滤处理的细胞培养上清液用作样品, 采用以下4种方法进行分离和纯化。纯化后的EV溶液分别使用NTA和ELISA进行分析。

<分离方法>

MassivEV™: MassivEV™ EV纯化分离柱PS/
MassivEV™ 细胞外囊泡 (EV) 纯化缓冲液套装
(本产品, PS亲和法)

TFF : 仅切向流过滤 (500 kDa)
TFF+AEX : 切向流过滤 (500 kDa) + 阴离子交换色谱法
TFF+SEC : 切向流过滤 (500 kDa) + 尺寸排阻色谱法

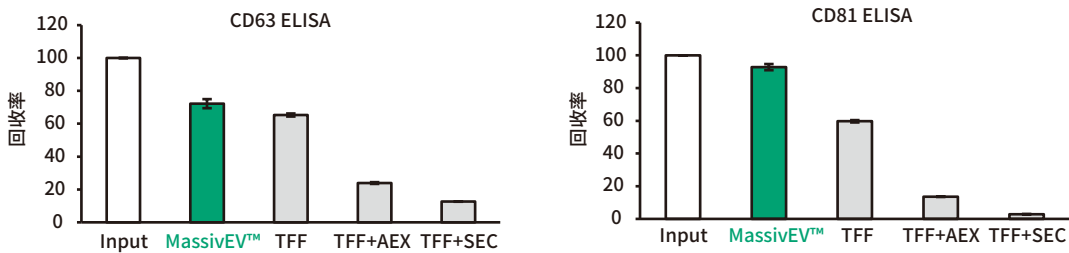
(1) 使用NTA进行粒子分析



【结果】

与TFF相比, MassivEV™ 纯化得到的粒子数量少, 但与TFF+AEX或TFF+SEC相比, MassivEV™ 纯化得到的颗粒数更多。

(2) 使用CD63 ELISA和CD81 ELISA的EV回收率比较 (n=3)



【结果】

相比传统方法, 使用MassivEV™ 的EV回收率更高。

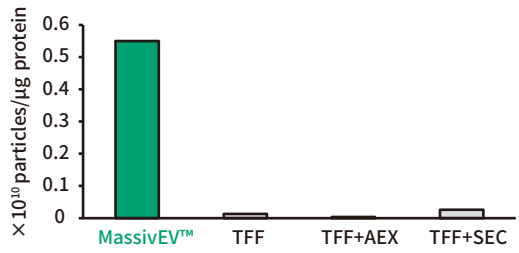
(3) 颗粒蛋白比 (纯度)

蛋白质与颗粒的比例可用于指示EV的纯度¹⁾。收集的EV溶液中总蛋白含量可以用BCA方法测定, 颗粒数可以用NTA测定。然后, 比较每1 μg蛋白质所含有的颗粒数。

1) Théry, C. et al.: J. Extracell. Vesicles, 7(1), 1535750(2018).

【结果】

使用MassivEV™ 获得的每1 μg蛋白质所含有的颗粒数都高于传统方法, 表明MassivEV™ 可以回收纯度更高的外泌体。



产品编号	产品名称	等级	规格
131-19491	MassivEV™ 细胞外囊泡 (EV) 纯化分离柱PS	基因研究用	1 mL
137-19493			5 mL

相关产品

MassivEV™ 细胞外囊泡 (EV) 纯化缓冲液套装

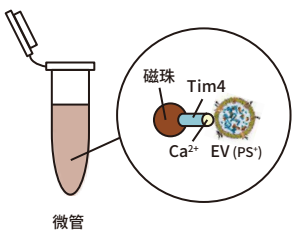
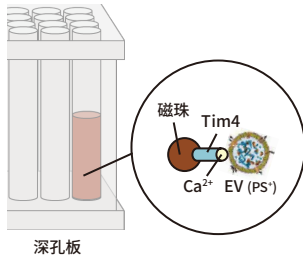
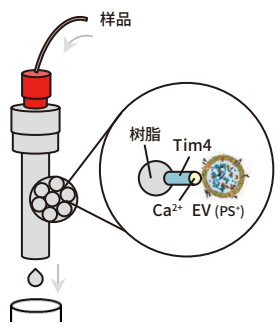
本产品是专为MassivEV™ EV纯化柱PS设计的缓冲液套装。



产品编号	产品名称	等级	规格
295-96601	MassivEV™ 细胞外囊泡 (EV) 纯化缓冲液套装	基因研究用	1 mL × 10次用 (5 mL × 2次用)

EV分离和纯化试剂盒选择指南

FUJIFILM Wako可提供一系列EV分离和纯化试剂盒，以满足各类研究需求。此外，基于PS亲和方法的分离纯化试剂盒具有相同的基本原理，可实现传统超速离心难以实现的应用，包括从升量级样本中进行分离和纯化，以及同时处理96个样本。在选择分离纯化试剂盒时，应考虑样本类型、样本体积以及一次处理的样本数量等因素。请参考下表，选择合适的试剂盒。

产品名称	MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver.2	MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS	MassivEV™ EV纯化分离柱PS
产品编号	294-84101 (2 tests) 290-84103 (10 tests)	293-96401 (96 tests)	131-19491 (1 mL) 137-19493 (5 mL)
原理	PS亲和法	PS亲和法	PS亲和法
概述			
样本	细胞培养上清液 生物体液 (血清/血浆/尿液/唾液等)	细胞培养上清液 生物体液 (血清/血浆/尿液/唾液等)	细胞培养上清液
样本体积	≤1 mL 超滤后可处理最大50 mL样本	≤5 mL 96孔板: ≤1 mL/24孔板: 1-5 mL (KingFisher™ Flex)	10 mL至数升
样本数量	1至数十个	数十个至96个 (KingFisher™ Flex)	1
必要设备	磁力架	自动提取设备	蠕动泵
特点	● 结合PS亲和法与磁珠的EV分离纯化试剂盒 ● 可分离纯化高纯度、完整的EVs ● 适用于多种样本类型，涵盖细胞培养上清液至各类体液 ● 适用于表面暴露磷脂酰丝氨酸的EVs ● 需使用磁珠捕获磁力架	● 结合PS亲和法与磁珠的EV分离纯化试剂盒 ● 可分离纯化高纯度、完整的EVs ● 可同时处理高达96个样本 ● 适用于多种样本类型，涵盖细胞培养上清液至各类体液 ● 适用于表面暴露磷脂酰丝氨酸的EVs ● 需要核酸和蛋白质提取使用的自动提取设备	● 基于PS亲和法的大规模EV纯化柱 ● 可分离纯化高纯度、完整的EVs ● 适用于处理10 mL至数升级别的样本 ● 适用于表面暴露磷脂酰丝氨酸的EVs ● 需专用缓冲液，蠕动泵以及送液管 (另售)
应用	基础研究 生物标志物发现	生物标志物发现	治疗性EVs的开发
页码	P13	P15	P17

具有EV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。建议在样品的超滤、纯化和保存前添加本产品。

特点

- 抑制样品管和移液器枪头等的EV吸附
- 保护EV免受反复冻融的损伤
- 操作简便，仅需直接添加至样品或纯化EV溶液中即可

推荐样品

- 细胞培养上清液
 - 纯化EV溶液
- ※ 在血清、血浆和干扰物质含量高的样本中，难以获得理想的防吸附效果。



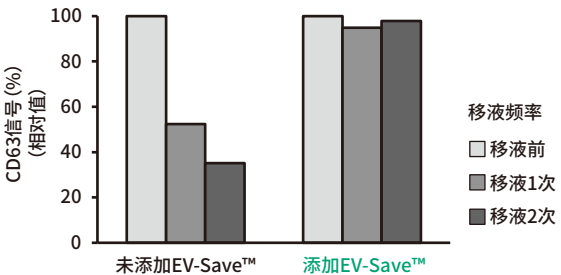
数据

▼ 吸附抑制效果

添加EV-Save™ (超滤用) 至使用PS亲和法纯化的COLO201细胞来源EV，静置3 min。然后，移至新的样品管中，重复本步骤。使用PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD) 检测样品管内的EV含量 (CD63信号)。

【结果】

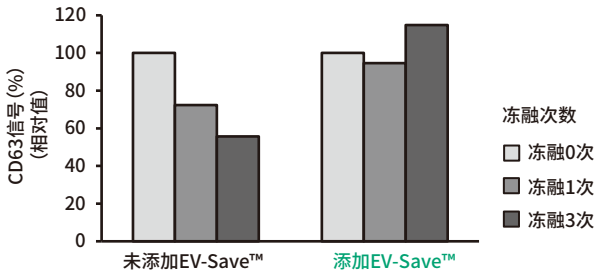
将样品移至新样品管时，CD63的信号减弱。但通过添加了EV-Save™ (超滤用) 几乎完全抑制移液引起的信号减弱。



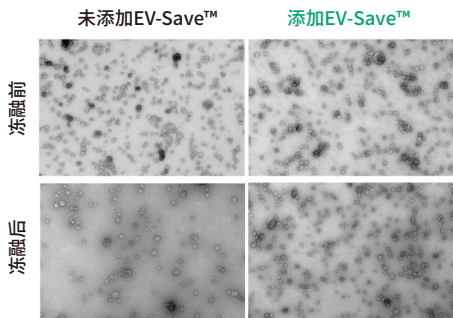
▼ 冷冻保护效果

添加EV-Save™ (超滤用) 至使用PS亲和法纯化的COLO201细胞来源EV后进行冻融。使用PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD) 检测样品管内的EV含量 (CD63信号)，使用透射电子显微镜分析EV的形态。

(1) ELISA



(2) 电子显微镜



【结果】

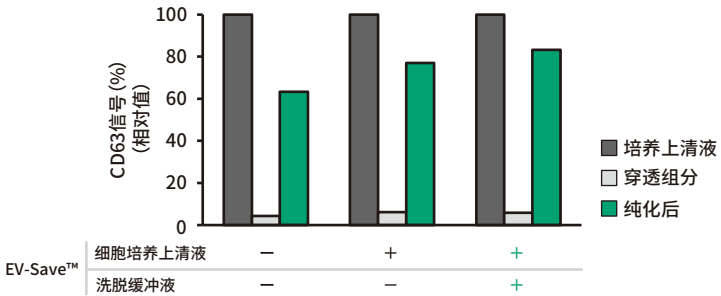
未添加EV-Save™ (超滤用) 的样品冻融后，CD63信号减弱。但通过添加EV-Save™ (超滤用) 可抑制冻融引起的信号减弱。电子显微镜下也可以观察EV-Save™ (超滤用) 抑制了粒子数的减少。

▼ 配合PS亲和法使用

使用PS亲和法从TIG3细胞培养上清液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。

【结果】

细胞培养上清液及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	等级	规格
058-09261	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EV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药物添加剂实例的成分,是一款可用于EV给药实验动物的EV吸附抑制剂和冷冻保护剂。

特点

- 抑制样品管和移液器枪头等的EV吸附
- 保护EV免受反复冻融的损伤
- 操作简便, 仅需将EV-Save™ 直接添加至样品或纯化EV溶液中即可
- 组成成分使用可排出体外的分子量以及具有药物添加剂实例的成分

推荐样品

- 细胞培养上清液
 - 纯化EV溶液及具有药物添加剂实例的成分
- ※在血清、血浆和干扰物质含量高的样品中, 难以获得理想的抗吸附效果。

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	×	✓

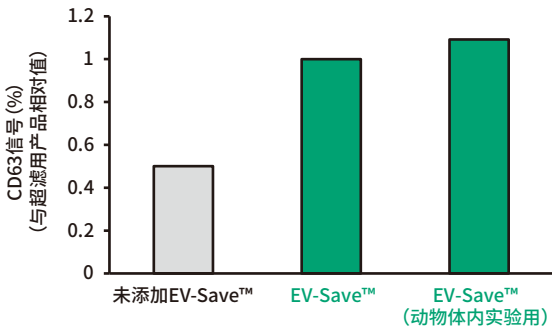
数据

▼ 吸附抑制效果

添加EV-Save™(超滤用)和EV-Save™(动物体内实验用)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) 检测样品管内的CD9信号。

【结果】

未添加EV-Save™ 的样品中,CD9信号减弱,但添加了EV-Save™(超滤用)和EV-Save™(动物体内实验用)的样品后可抑制信号减弱。

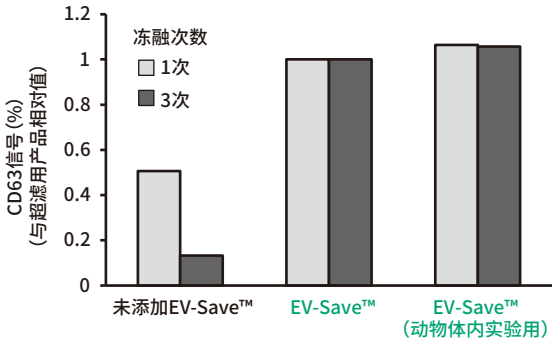


▼ 冷冻保护效果

添加EV-Save™(超滤用)和EV-Save™(动物体内实验用)至PS亲和法纯化COLO201细胞来源EV,反复冻融1或3次。使用PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP) 检测样品管内的EV含量(CD9信号)。

【结果】

未添加EV-Save™ 的样品中,冻融后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。



产品编号	产品名称	等级	规格
050-09461	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

抑制切向流过滤步骤中的EV吸附

EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂(TFF用)

切向流过滤法(TFF)作为一种高效的方法被用于细胞外囊泡(EV)浓缩和缓冲液置换。TFF通过将样品与滤膜平行流动来防止样品在滤膜上堆积,尽可能地减少样品损失。另外,EV等易吸附的样品由于膜吸附和过滤操作中的物理应力,回收率可能会降低。本产品旨在通过减轻TFF处理过程中的物理应力以及膜的吸附来提高EV回收率。使用本产品可实现高效、稳定的EV回收。

特点

- 抑制使用TFF进行EV纯化、浓缩和缓冲液置换过程中的EV损伤和EV对滤膜的吸附
- 操作简便,仅需向样品添加本产品和平衡缓冲液
- 本产品可防止因吸附于试管而导致的EV损失,并防止冻融损伤,过滤后(TFF)的EV溶液可以直接保存。

※ 注:仅在缓冲液交换过程中添加本产品才能达到此效果。

推荐样品

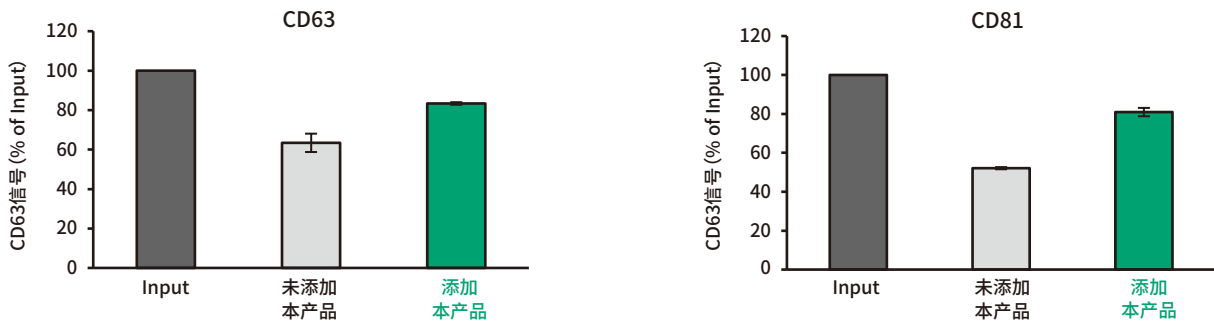
- 纯化的EV
 - 细胞培养上清液
- ※ 在血清、血浆和杂志含量高的样品中,难以获得理想的防吸附效果。

数据

提高基于TFF从细胞培养上清液中纯化EV的回收率

使用TFF将细胞培养上清液浓缩20倍,然后用100倍的缓冲液进行置换。将本品以1/100的量添加至细胞培养上清液和置换缓冲液中。使用CD63和CD81的ELISA试剂盒检测EV的回收率,使用Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) 检测EV粒子粒径分布。

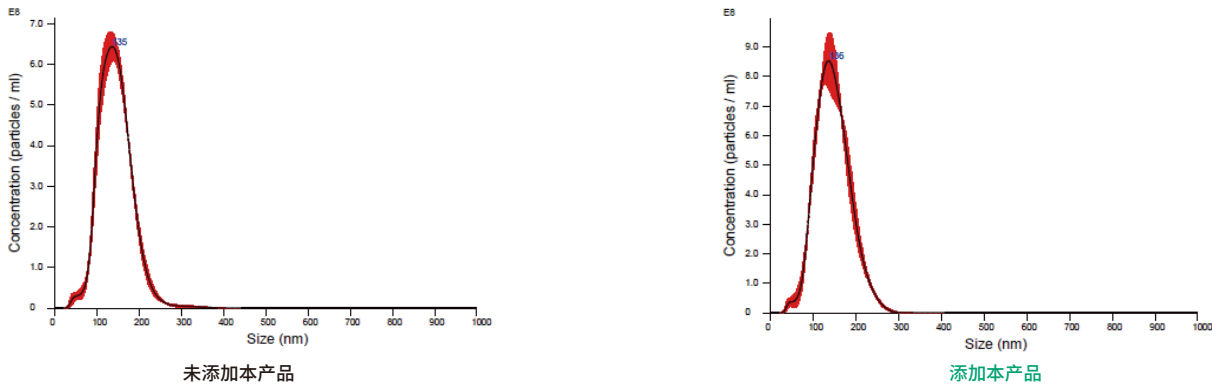
(1) ELISA



【结果】

通过添加本产品,可以观察到从细胞上清液中纯化EV的回收率有所提升。

(1) NTA



【结果】

添加本产品后,EV的粒子粒径分布并未观察到明显变化。

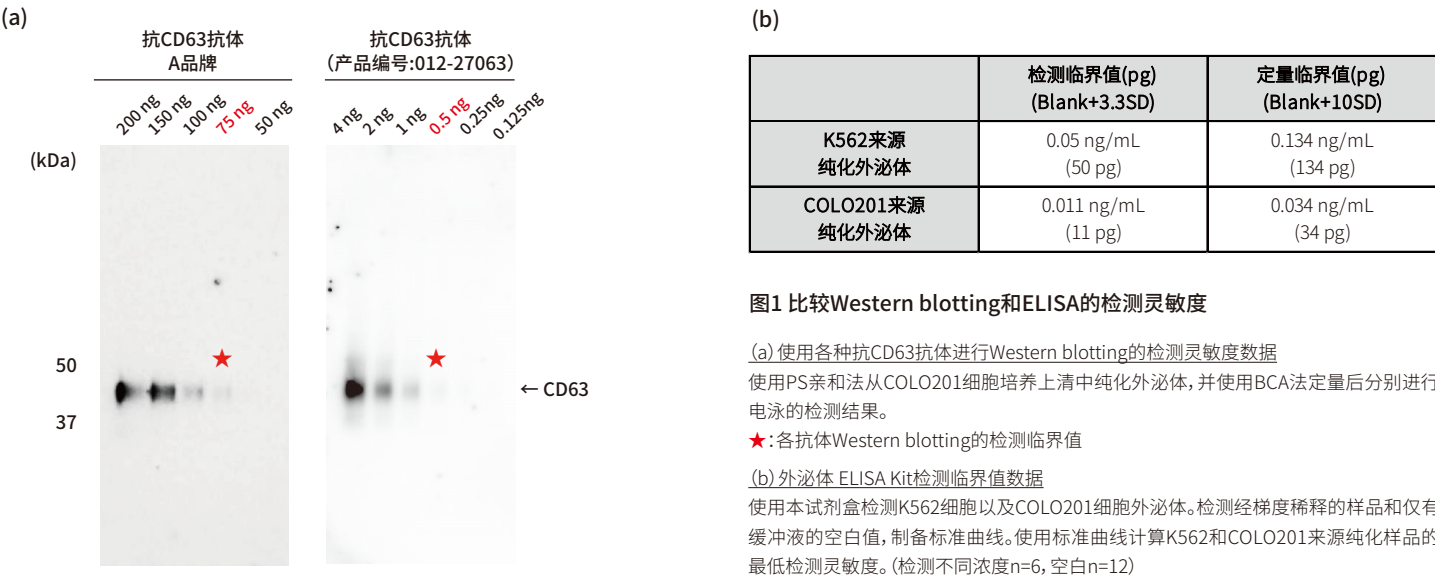
产品编号	产品名称	等级	规格
059-09671	EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂(TFF用)	基因研究用	20 mL

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。



外泌体ELISA试剂盒选择表

	PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒		CD9/CD63/CD81-Capture人外泌体ELISA试剂盒		
产品编号	297-79201	298-80601	296-83701	290-83601	292-83801
产品名称	PS Capture™ 外泌体ELISA 试剂盒 (抗小鼠IgG POD)	PS Capture™ 外泌体ELISA 试剂盒 (链霉亲和素HRP)	CD9-Capture人外泌体ELISA 试剂盒 (链霉亲和素HRP)	CD63-Capture人外泌体ELISA 试剂盒 (链霉亲和素HRP)	CD81-Capture人外泌体ELISA 试剂盒 (链霉亲和素HRP)
规格	96次用	96次用	96次用	96次用	96次用
捕获分子	Tim4	Tim4	抗人CD9抗体 (大鼠)	抗人CD63抗体 (小鼠)	抗人CD81抗体 (小鼠)
检测抗体 (试剂盒随附)	抗人CD63抗体 (小鼠)	抗人CD63抗体 (小鼠)	抗人CD9抗体 (大鼠)	抗人CD63抗体 (小鼠)	抗人CD81抗体 (大鼠)
酶结合方法	二抗	生物素-链霉亲和素	生物素-链霉亲和素	生物素-链霉亲和素	生物素-链霉亲和素
样本	纯化EVs 细胞培养上清液 ^{*1}	纯化EVs 细胞培养上清液 体液 (血清、血浆等)	纯化EVs 细胞培养上清液 体液 (血清、血浆等)	纯化EVs 细胞培养上清液 体液 (血清、血浆等)	纯化EVs 细胞培养上清液 体液 (血清、血浆等)
物种	人、小鼠、大鼠等 ^{*2}	人、小鼠、大鼠等 ^{*2}	人	人	人
检测对象	PS阳性EVs ^{*3}	PS阳性EVs ^{*3}	人CD9阳性EVs	人CD63阳性EVs	人CD81阳性EVs

1. 检测用二抗会与人、小鼠、大鼠的IgG非特异性结合, 因此不可使用血清或血浆样本进行检测。
2. 试剂盒随附抗体为抗人CD63 抗体, 检测非人源样本时, 请使用适配的抗体。
3. 若使用的是未去除EV的FBS, 则需另外检测FBS来源的PS阳性EV。

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EVs和细胞培养上清EVs, 以及定量分析细胞培养上清EVs的ELISA试剂盒。

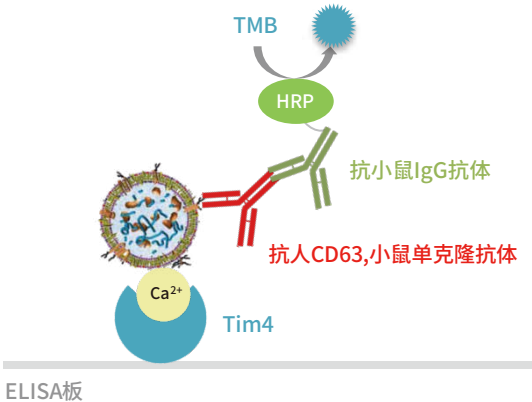
特点

- 使用PS亲和法强力捕获样本中的EV
- 微量样本即可检测
- 高灵敏度, 约为WB法的50-1,000倍
- 附带检测用抗人CD63抗体和HRP标记抗小鼠IgG抗体

注意

- 检测用二抗会与人、小鼠、大鼠的IgG非特异性结合, 因此不可使用血清或血浆样本进行检测。
- 试剂盒随附抗体为抗人CD63抗体, 检测非人源样本时, 请使用适配的抗体。
- 若使用的是未去除EV的FBS, 则需另外检测FBS来源的PS阳性EV。

检测原理

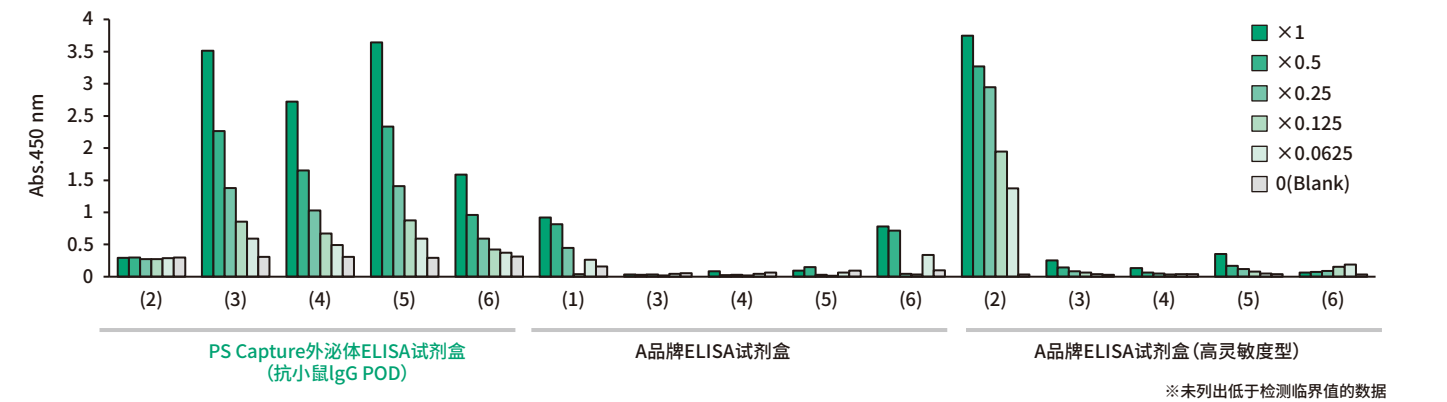


数据

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EV标志物CD63, 并比较检测灵敏度。

编号	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
样本	A品牌ELISA试剂盒 配套标准品	A品牌ELISA试剂盒 (高灵敏度型) 配套标准品	PS亲和法纯化的 COLO201细胞 培养上清来源EV	聚合物沉淀法纯化的 COLO201细胞 培养上清来源EV	PS亲和法纯化的 人血清来源EV	聚合物沉淀法纯化的 人血清来源EV
×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



结果

与其他品牌相比, 本产品可检测多种样本, 且低浓度的样本也可实现高灵敏度检测。

产品编号	产品名称	等级	规格
297-79201	PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD)	基因研究用	96 tests

可从体液样本中直接检测的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) 可用于定性或定量检测细胞培养上清和体液样品中的外泌体。PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD) 仅可使用小鼠单克隆抗体作为检测抗体, 而本试剂盒可以使用生物素标记的各种动物的抗体或凝集素进行检测。另外本试剂盒使用HRP标记链霉亲和素进行检测, 其与血液成分的非特异性结合较低, 因此无需分离和纯化即可高灵敏地检测血液样品中的EV, 而这是传统试剂盒难以实现的。

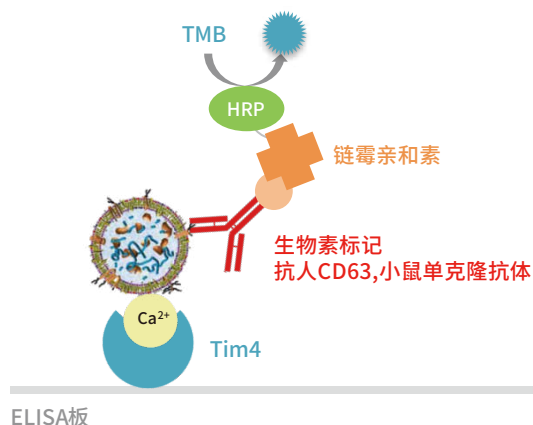
特点

- 灵敏度是WB法的50-1,000倍
- 可从2.5 μ L左右血液样本中检测EV, 节约样本
- 无需分离EV, 可直接检测细胞培养上清和体液样本
- 捕获的EV可使用生物素标记的各种动物来源的抗体或凝集素等进行检测
- 操作简单, 再现性高
- 应用范围广泛
 - 定性或定量检测细胞培养上清和血液样本中的EV
 - 检测“无外泌体血清” (EV-depleted FBS) 中残留的EV
 - 使用凝集素分析EV的糖链

【注意】

- 试剂盒随附抗体为抗人CD63抗体, 检测非人源样本时, 请使用适配的抗体。
- 若未使用无外泌体FBS, 则也会检测到FBS来源的PS阳性EV。

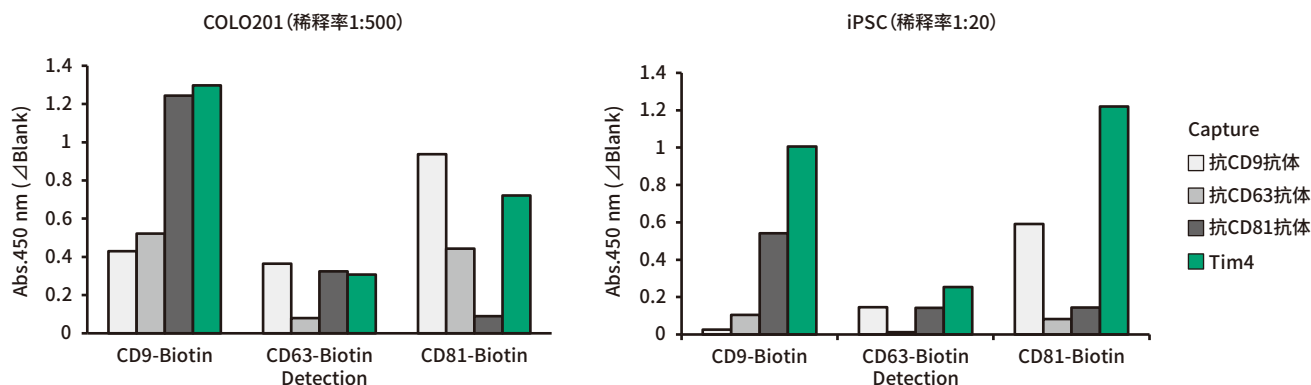
检测原理



数据

▼ PS亲和法和抗体法的EV捕获效率

每种细胞培养上清经前处理 (10,000 $\times$ g, 30 min) 后, 加入包被有抗CD抗体 (CD9/CD63/CD81) 以及Tim4的微孔板孔中。然后, 使用生物素标记的抗CD抗体 (CD9/CD63/CD81) 检测捕获的EV。



【结果】

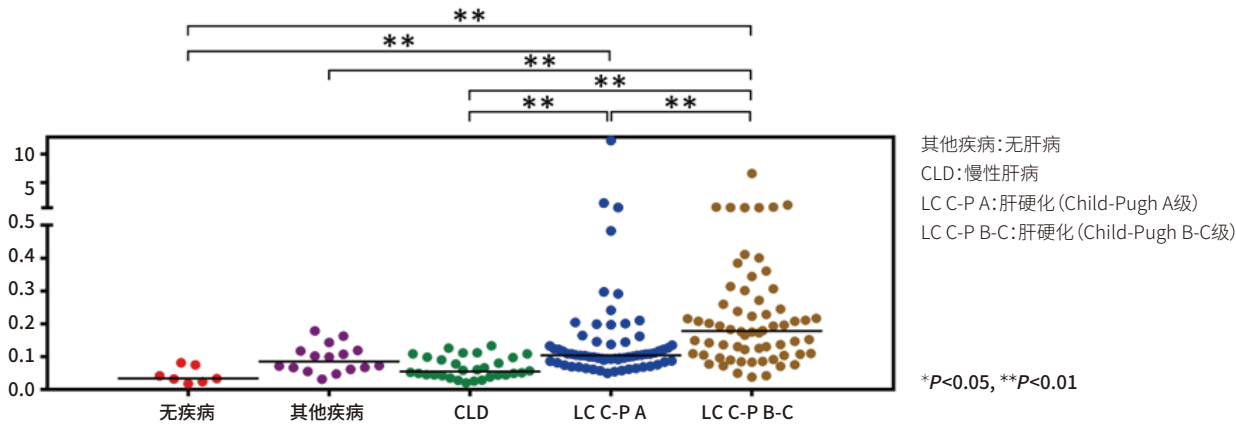
PS亲和法捕获EV的效率与抗体法相当甚至更高。

常用的EV表面标志物 (CD9/CD63/CD81) 的表达模式会因产生EV的细胞类型和生理状态不同而存在显著差异。相比之下, PS广泛存在于多种EV中, 因此通过捕获PS能够实现更全面的EV回收和分析。

▼ 肝硬化患者EVs中已鉴定的纤维化相关标志物

使用本产品与生物素标记的大鼠单克隆抗体Anti-CD9 (77B) 结合, 以及市售的抗Fibulin-4抗体, 检测人血清中的CD9和Fibulin-4水平。然后比较Fibulin-4与CD9的比值。抗Fibulin-4抗体采用Biotin Labeling Kit-NH2 (产品编号: 347-90891, 同仁化学研究所) 进行了生物素标记¹⁾。

1) Kumagai, M. et al.: *FEBS Open Bio*, **14**(8), 1264(2024).



此数据转载自参考文献1), 遵循CCBY 4.0许可协议。

【结果】

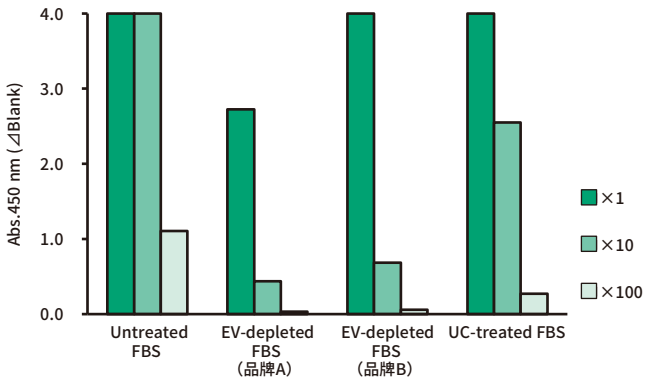
随着肝脏病变的进展, Fibulin-4/CD9的中位值升高, 慢性肝病 (CLD) 与Child-Pugh A级之间, 以及CLD与Child-Pugh B-C级肝硬化之间存在显著差异。Child-Pugh A级和Child-Pugh B-C级之间也存在显著差异。这些数据表明, 血清细胞外囊泡 (EV) 中的Fibulin-4是一种新型纤维化标志物。

▼ 确认EV-depleted FBS中残留的EV

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的外泌体残留量。

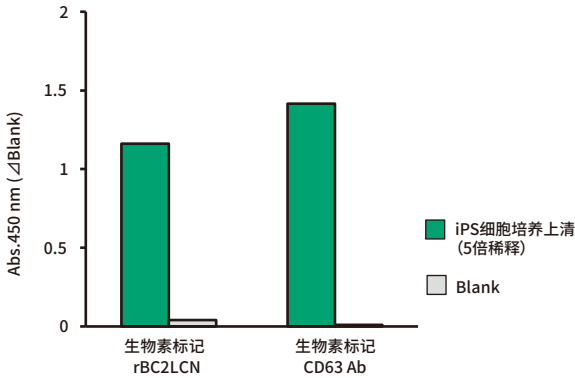


▼ 应用于糖链分析

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】

可成功检测到外泌体表面的糖链。



产品编号	产品名称	等级	规格
298-80061	PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素)	基因研究用	96 tests

特异性检测和定量人来源外泌体

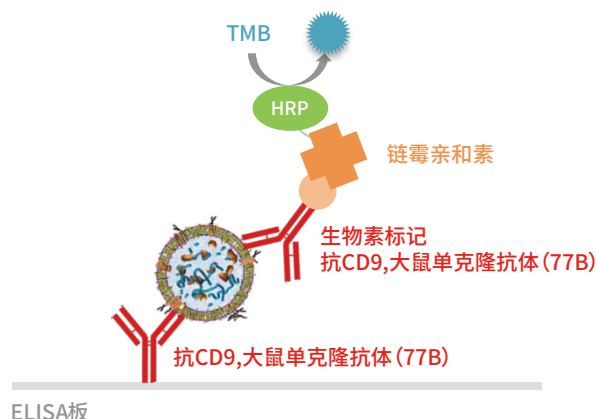
CD9/CD63/CD81-Capture人外泌体ELISA试剂盒(链霉亲和素HRP)

CD9/CD63/CD81-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
- 通过更换检测抗体,还能检测表达多种EV标志蛋白的EV(例如,CD9和CD63阳性的EV)。

检测原理(CD9-Capture人外泌体ELISA试剂盒)



数据

▼ 比较人来源外泌体检测中的特异性

将含有10% FBS(经超速处理)的D-MEM培养基稀释2倍,并加入不同量的COLO201细胞来源的纯化EV(产品编号:052-09301),将混合液在两款ELISA试剂盒的孔板中进行反应,使用与人和牛CD9均有交叉反应的抗CD9抗体(克隆号:1K)进行检测。

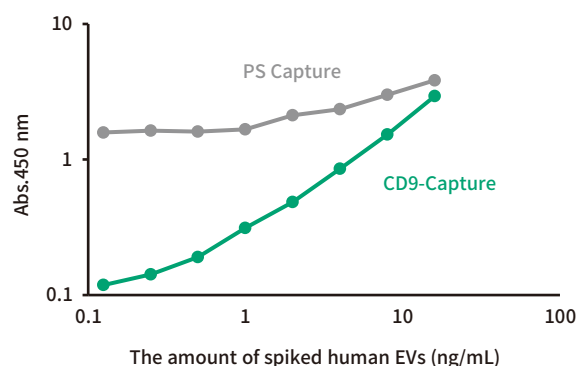
【使用试剂盒】

PS Capture: PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒(链霉亲和素HRP)

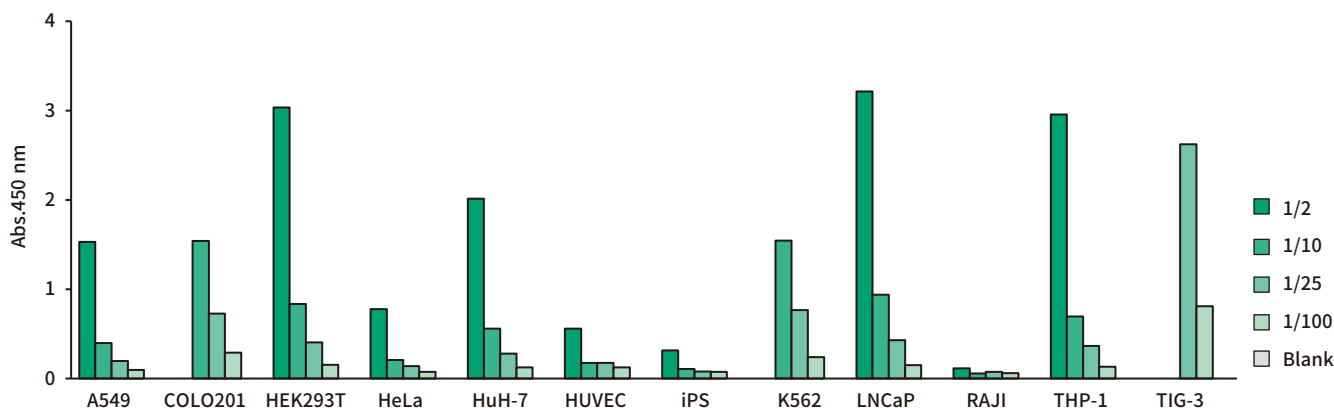
CD9-Capture: CD9-Capture人外泌体ELISA试剂盒(链霉亲和素HRP)

【结果】

PS亲和法也捕获牛源外泌体(残留于经超速离心处理的FBS中),CD9捕获板则能够特异性人源EV,并能实现高灵敏检测。



▼ 各种细胞系中EV标记蛋白的分析(CD63-Capture人外泌体ELISA试剂盒(链霉亲和素HRP))



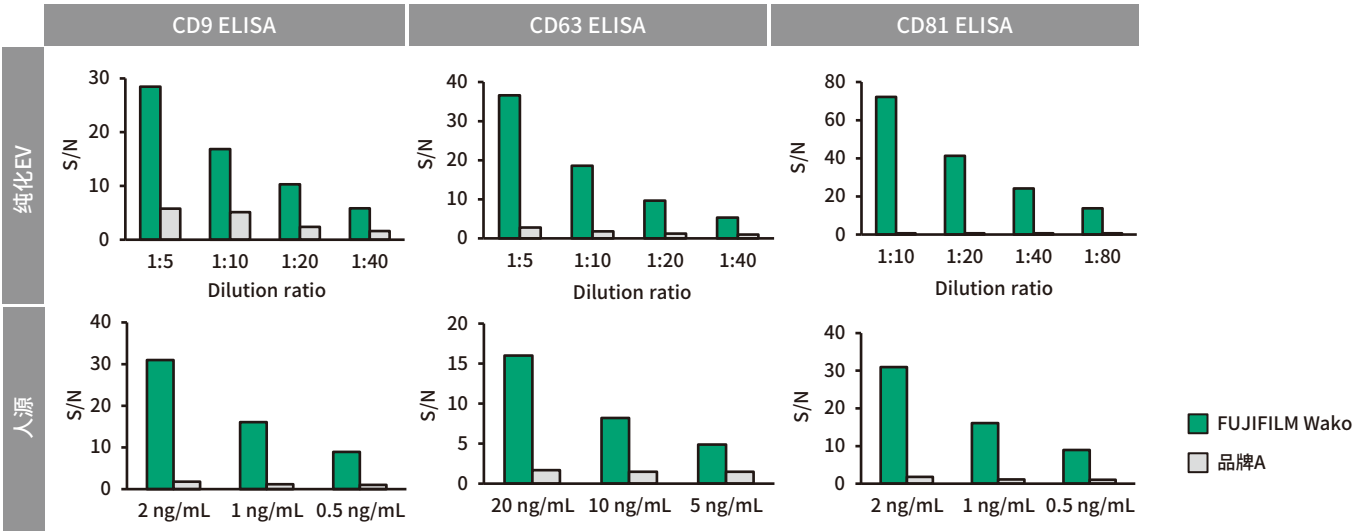
【结果】

本产品可检测各种细胞类型中的EV标记蛋白。

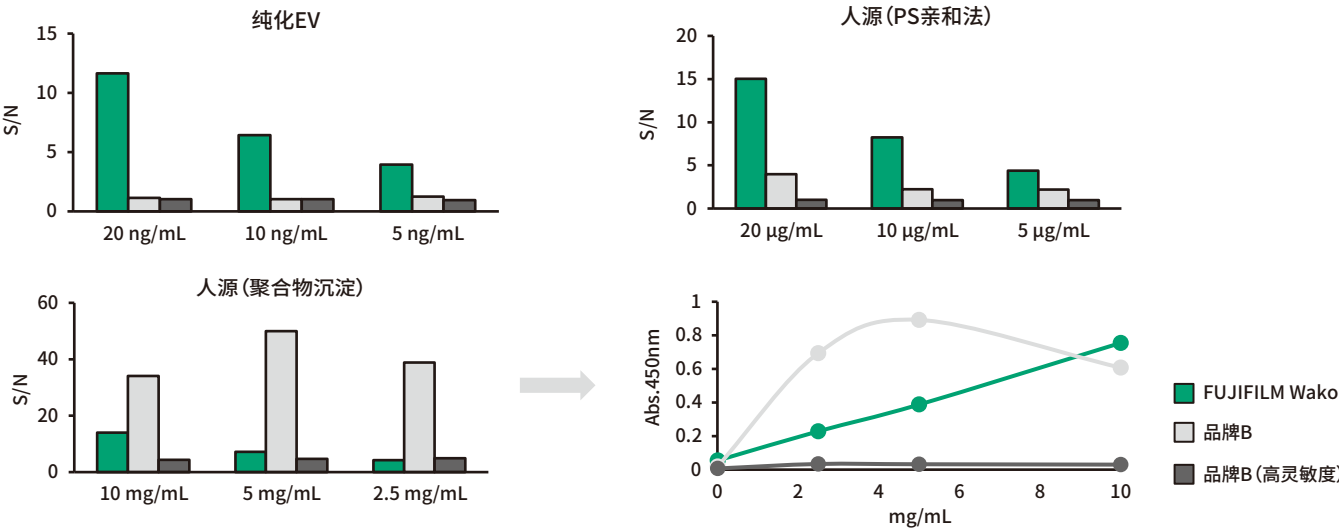
▼与竞品的性能比较

使用不同品牌的ELISA试剂盒,对来自COLO201细胞和人血清的纯化EV的连续稀释样品进行检测。
信噪比(S/N)是指检测值与基线值的比值,比较不同试剂盒之间的信噪比。

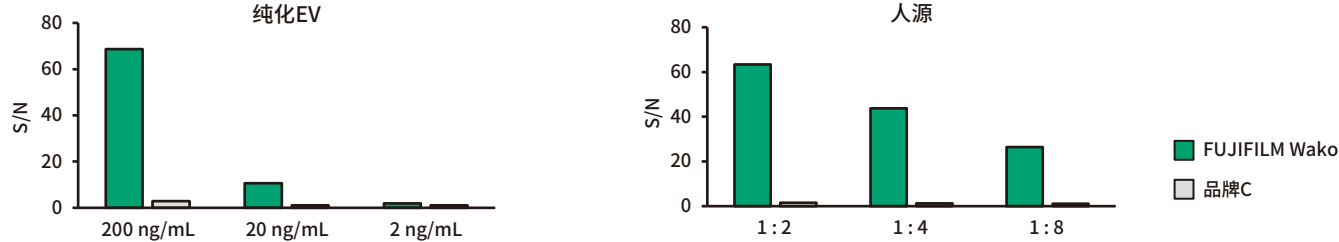
(1) 与品牌A ELISA试剂盒的比较 (CD9/CD63/CD81)



(2) 与品牌B ELISA试剂盒的比较 (CD63)



(3) 与品牌C ELISA试剂盒的比较 (CD63)



【结果】

本产品表现出优异的稀释线性,且与其他品牌相比,能够以更高的S/N比检测EV标志蛋白。

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

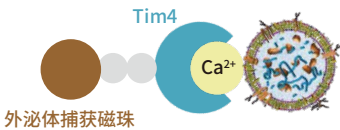
推荐样本

- 细胞培养上清
- 血清
- 血浆 (EDTA/肝素)

检测原理

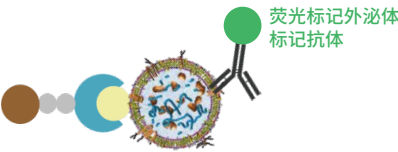
(1) 外泌体分离

通过外泌体捕获磁珠, 从样品中分离外泌体



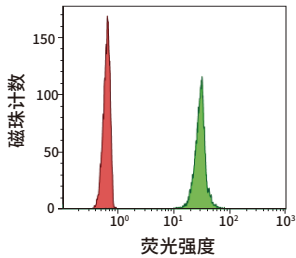
(2) 外泌体染色

使用荧光标记抗外泌体标记抗体染色外泌体

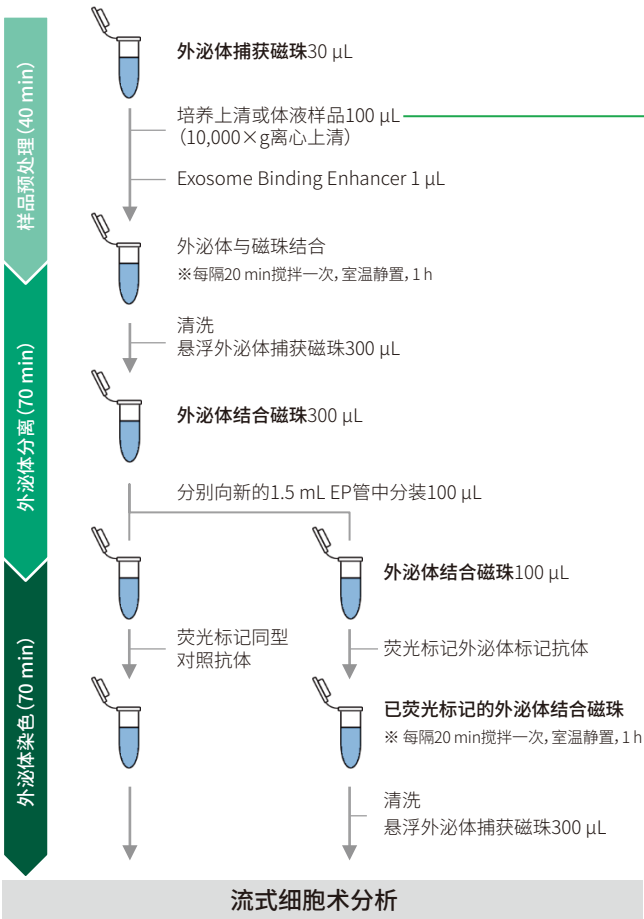


(3) 流式细胞术分析

外泌体结合磁珠状态下, 进行流式细胞术分析



实验流程



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。

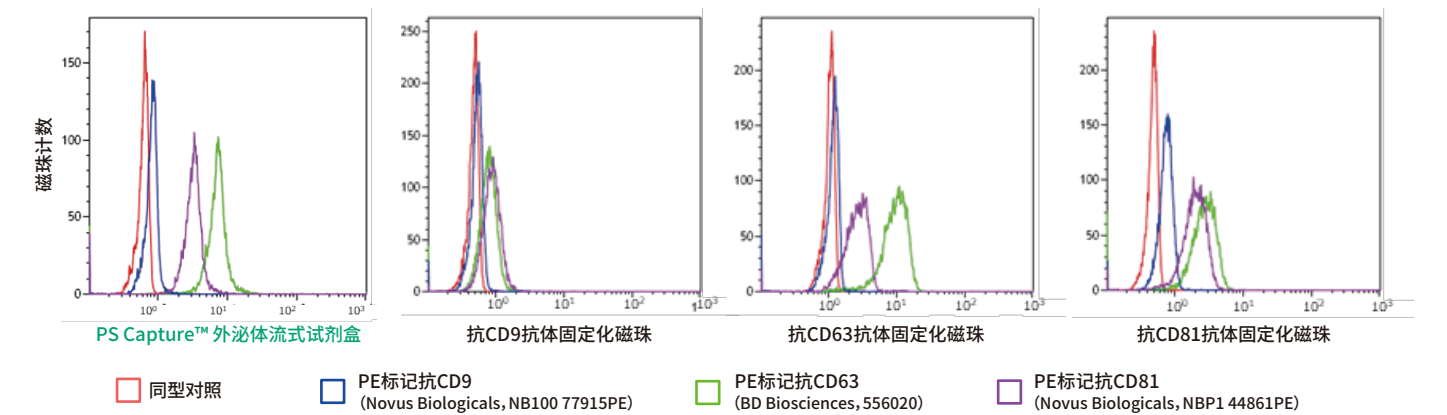
※最大反应次数为10次反应 (1.5 mL EP管/反应)

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

数据

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。

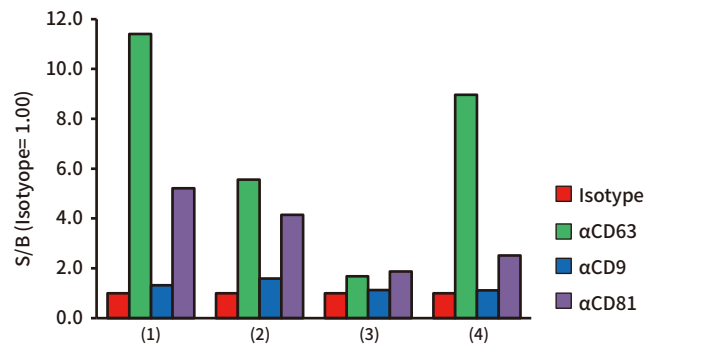


参考数据: 比较S/B (即Signal/Background, 信噪比)

- (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

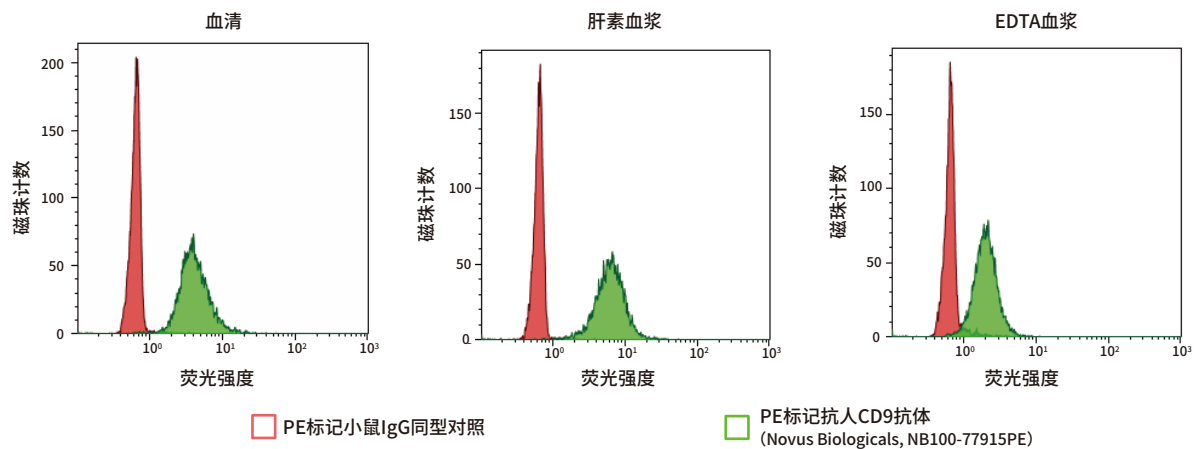
结果

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EV表面抗原

分别将100 μL人血清、肝素血浆、EDTA血浆（缓冲液已更换）中的EV固定在磁珠上，并通过PE标记抗小鼠IgG同型对照以及PE标记抗人CD9抗体检测EV。



结果

使用本产品, 可以检测人血清和血浆 (肝素/EDTA) 中的CD9。

产品编号	产品名称	等级	规格
297-79701	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
- 识别非还原样品



FUJIFILM Wako的抗体能够高灵敏度地检测天然EV标记蛋白!

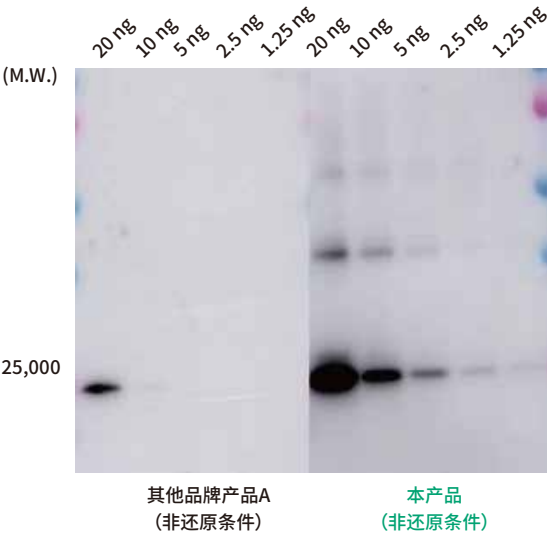
产品一览

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	-	-	生物素
产品编号		014-27763	019-27953	019-28173	017-28211	012-27063	019-27713	011-27773	010-28223	011-28111

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

数据

▼ 通过Western blotting比较抗CD9抗体的性能

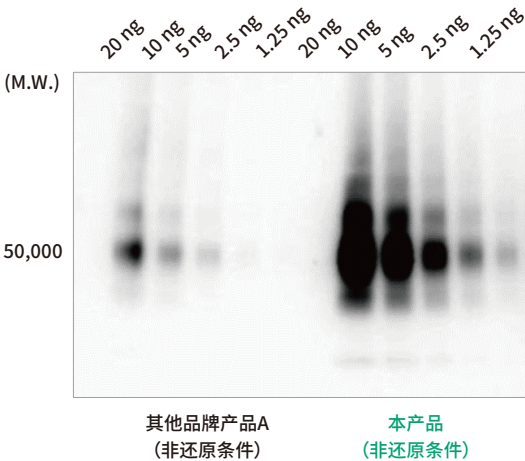


样品: COLO201细胞来源纯化外泌体
分离方法: PS亲和法
一抗: 抗CD9, 单克隆抗体 (1K)
二抗: 过氧化物酶标记抗小鼠IgG (H+L) 抗体
检测试剂: ImmunoStar® Zeta (产品编号: 291-72401)

【结果】

在非还原条件下, 相比竞品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

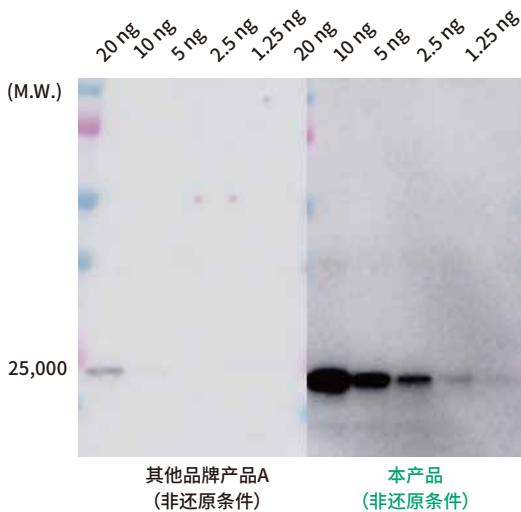


样品: COLO201细胞来源纯化外泌体
分离方法: PS亲和法
一抗: 抗CD6, 单克隆抗体 (3-13)
二抗: 过氧化物酶标记抗小鼠IgG (H+L) 抗体
检测试剂: ImmunoStar® Zeta (产品编号: 291-72401)

【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	等级	规格
014-27763	抗CD9单克隆抗体 (1K)	免疫化学用	100 μL
019-27953	抗CD9大鼠源单克隆抗体 (30B), 生物素偶联		100 uL
019-28173	抗CD9大鼠单克隆抗体 (77B)		100 μL
017-28211	抗CD9大鼠单克隆抗体 (77B), 生物素偶联		50 μL
012-27063	抗CD63单抗 (3-13)		100 μL
019-27713	抗CD63单克隆抗体 (3-13), 生物素偶联		100 μL
011-27773	抗CD81单克隆抗体 (17B1)		100 μL
010-28223	抗CD81, 大鼠单克隆抗体 (9B)		100 uL
011-28111	抗CD81, 大鼠单克隆抗体 (9B), 生物素偶联		50 uL

适用于EV生产的间充质干细胞增殖培养基

MSCulture™ High Growth基础培养基及配套添加剂

MSCulture™ High Growth基础培养基及配套添加剂是一款专为支持间充质干细胞 (MSC: Mesenchymal Stem Cell) 在维持高细胞质量状态下高效增殖而设计的生长培养基。适用于多种组织来源的MSC, 包括骨髓、脂肪组织和脐带基质。与传统 MEMα及其他MSC生长培养基相比, 具有更强的增殖支持能力。使用本产品扩增后的MSC, 可转移至EV-Up™ MSC EV生产用基础培养基及配套添加剂中培养, 从而实现包括外泌体在内的细胞外囊泡 (EVs) 的高效、大规模生产。

【注意】 MSCulture™ High Growth基础培养基及配套添加剂应搭配您选择的血清。

特点

- 高增殖率
- 维持MSC质量, 且不发生形态退化
- 可高效生产EV

通过高效增殖来减小培养规模!

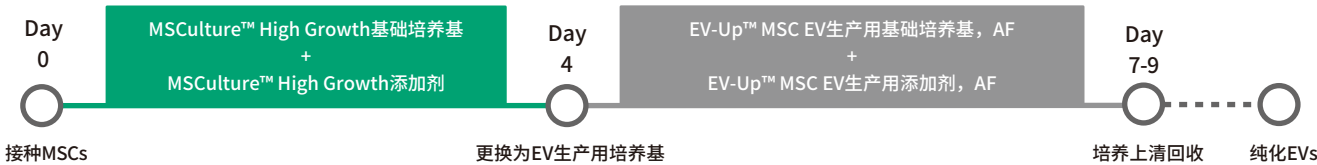
适用细胞

本产品可用于多种MSCs, 无物种限制。

▼ 验证的细胞系

- 骨髓来源MSC
- 脂肪组织来源MSC
- 脐带基质来源MSC

Protocol



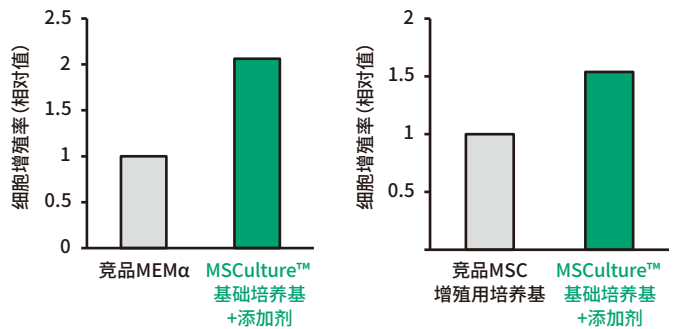
数据

▼ 细胞增殖率比较

分别使用本产品、竞品MEMα和竞品MSC生长培养基, 比较骨髓来源MSC的细胞增殖率。

【结果】

与竞品的MEMα和MSC生长培养基相比, 本产品的细胞增殖率更高。

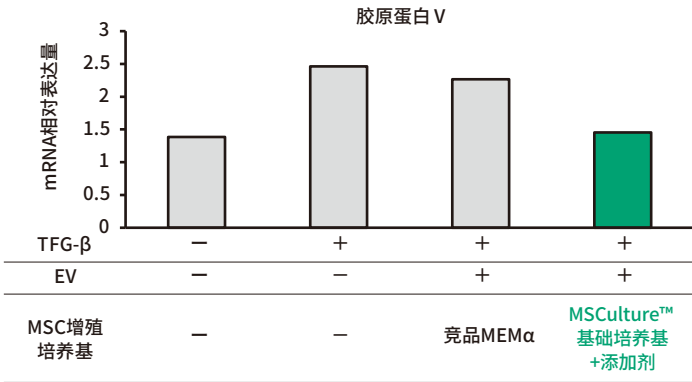


▼ MSC来源EV的抗纤维化活性比较

分别使用本产品和竞品MEMα培养骨髓来源MSC, 然后转移至EV-Up™ 间充质干细胞外泌体生产用基础培养基及配套添加剂来生产EVs。用PS亲和法从培养上清液中纯化EVs。将纯化的EVs (5 × 10⁷ particles/mL) 添加到TGF-β刺激的人胚肺成纤维细胞 (TIG-3), 通过定量纤维化标记 (胶原V) 基因表达来比较抗纤维化活性。

【结果】

本产品增殖的MSCs来源EVs, 抑制了TGF-β诱导的胶原蛋白V的表达。



产品编号	产品名称	等级	规格
132-19345	MSCulture™ High Growth基础培养基	细胞培养用	500 mL
133-19331	MSCulture™ High Growth添加剂	细胞培养用	5 mL

MSC用EV生产培养基

EV-Up™ MSC EV生产用基础培养基/添加剂, AF

EV-Up™ MSC EV生产用基础培养基, AF是间充质干细胞 (MSC: Mesenchymal Stem Cell) 专用的EVs生产用培养基, 无血清, 无动物源成分。与另售的EV-Up™ MSC EV生产用添加剂配合使用时, 可提升EV产量。

特点

- 与传统血清培养基相比, EV产量增加
- EV生物活性提高
- 维持MSC高存活率

适用细胞

适用于多种MSC, 无物种限制。

细胞示例

- 骨髓来源MSC
- 脂肪来源MSC
- 脐带基质来源MSC



相同的规模下, 仅需更换培养基, 即可高效生产具有生物活性的EV!

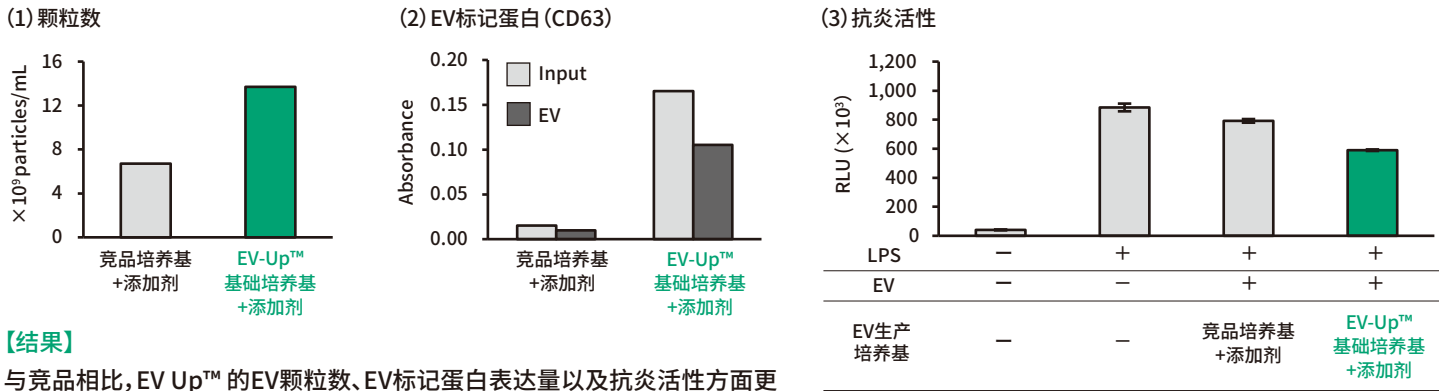
Protocol



数据

与竞品EV生产培养基的性能对比

使用MSCulture™ 扩增骨髓来源MSCs, 然后分别换用竞品培养基或EV-Up™ 诱导EV生产。采用PS亲和法和从5 mL细胞培养上清中纯化EVs, 比较EV颗粒数 (NTA)、EV标记蛋白表达量 (PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP)) 以及抗炎活性 (RiboNAT™ Pyrogen Detection Kit)。



【结果】

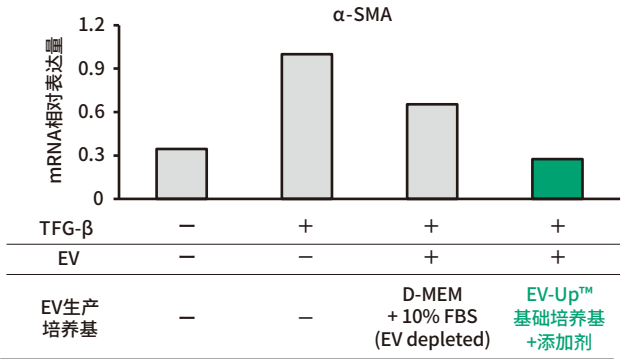
与竞品相比, EV Up™ 的EV颗粒数、EV标记蛋白表达量以及抗炎活性方面更优异。

不同培养基生产的EVs抗纤维化活性

采用PS亲和法从人骨髓来源MSC的细胞培养上清中纯化EVs (浓度5 × 10⁸ particles/mL)。然后, 将这些EVs添加至经TGF-β刺激的人胎胚肺成纤维细胞 (TIG-3细胞) 中, 通过RT-PCR定量纤维化标志物α-SMA的mRNA水平, 评估抗纤维化活性。

【结果】

与传统培养基生产的EVs相比, 在EV-Up™ 培养基中培养的MSC生产的EVs表现出更强的抗纤维化活性。



产品编号	产品名称	等级	规格
053-09451	EV-Up™ MSC EV生产用基础培养基, AF	细胞培养用	95 mL
298-84001	EV-Up™ MSC EV生产用添加剂, AF	细胞培养用	100 mL用

EV实验阳性对照用

外泌体, COLO201细胞来源, 纯化物

本产品为采用PS亲和法从COLO201细胞培养上清中分离纯化的细胞外囊泡 (EVs), 可用作EV实验中的阳性对照品或校准品。

特点

- 高纯度
- 高稳定性
- 未冻干
- CD9/CD63/CD81阳性

规格

性状: 溶液
配方: EVs、TBS、EDTA及聚合物 (稳定剂)
蛋白浓度*: 10 µg/mL
※ 各产品的蛋白浓度根据EV标记蛋白的信号值计算
外泌体, COLO201细胞来源, 纯化物 (CD9) → CD9
外泌体, COLO201细胞来源, 纯化物 (CD63) → CD63
外泌体, COLO201细胞来源, 纯化物 (CD81) → CD81

数据

▼ 与竞品比较

使用“外泌体, COLO201细胞来源, 纯化物 (CD63)”和5种竞品的EV作为样品, 比较能否检测CD63信号。所有样品均按照各厂家的浓度调整至10 ng/Lane进行检测。

■ 一抗

抗CD63单克隆抗体 (3-13) (产品编号: 012-27063)

■ 二抗

HRP标记的抗小鼠IgG

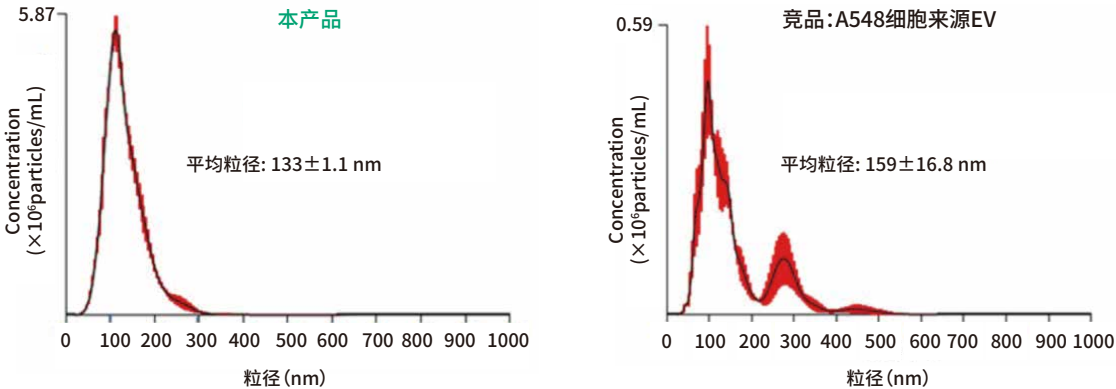
【结果】

只有本产品可在非还原条件下检测到CD63信号。



▼ 使用NanoSight分析EV粒径

采用NanoSight进行纳米颗粒跟踪分析 (NTA), 对外泌体, COLO201细胞来源, 纯化物 (CD63) 及竞品进行粒径分析。



【结果】

与竞品相比, 本产品的粒径更均一。

产品编号	产品名称	等级	规格
056-09701	外泌体, COLO201细胞来源, 纯化物 (CD9)	基因研究用	50 µL
052-09301	外泌体, COLO201细胞来源, 纯化物 (CD63)	基因研究用	50 µL
053-09711	外泌体, COLO201细胞来源, 纯化物 (CD81)	基因研究用	50 µL

*“外泌体, COLO201细胞来源, 纯化物 (CD63)” 与 “外泌体, COLO201细胞来源, 纯化物” (产品编号 052-09301) 为同一产品, 产品名称已变更。

纯化细胞外囊泡专用RNA提取试剂盒

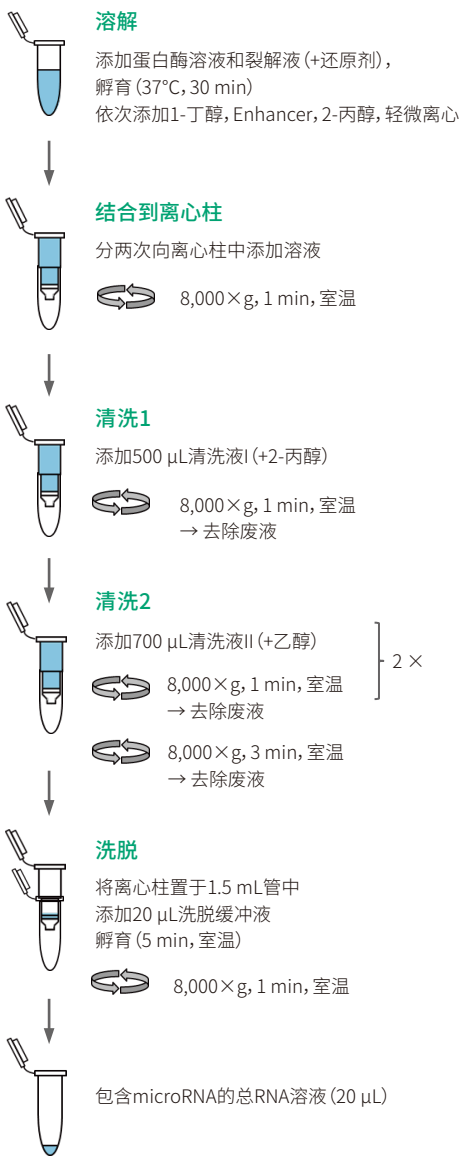
纯化EV用RNA提取试剂盒

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

Protocol



适用样品

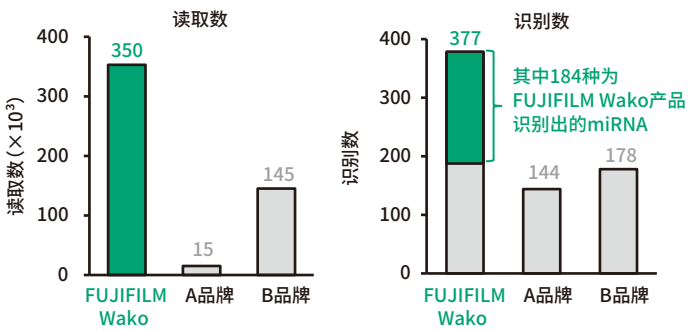
样品: 细胞培养上清、血清和血浆中纯化的外泌体溶液
※ 暂无细胞培养上清、血清和血浆中直接提取RNA的实例

应用: RT-qPCR、微阵列分析、二代测序 (NGS) 等

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。



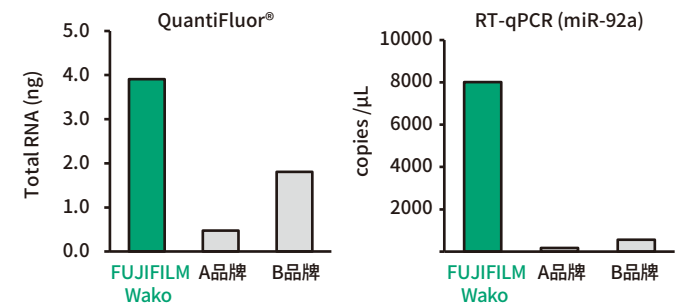
【结果】

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	等级	规格
294-84601	纯化EV用RNA提取试剂盒	基因研究用	20 tests

*本产品与“纯化细胞外囊泡 (EV) 用miRNA提取试剂盒”为同一产品, 产品名称于2025年10月更改。

高灵敏定量EV来源微量RNA

纯化EV用RNA定量试剂盒

纯化EV用RNA定量试剂盒用于定量检测从细胞培养上清液、血清或血浆中纯化的外泌体等细胞外囊泡 (EV: Extracellular Vesicle) 的总RNA。试剂盒使用RNA结合荧光染料, 可高灵敏定量检测溶液中的微量RNA。在EV研究中, 新一代测序 (NGS) 或基因芯片分析前处理步骤中需要定量检测RNA时, 推荐使用本产品。

特点

- 适用于少量 (1-20 μL) RNA样品
- 高灵敏度, 定量范围: 0.01-10 ng/ μL
- 检测时间短, 反应时间: 5 min

样本

纯化EV

EV分离与纯化推荐使用MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (产品编号: 290-84103)

RNA提取与纯化推荐使用microRNA Extractor® Kit for Purified-EV (产品编号: 294-84601)

Protocol

1. 试剂制备

1×稀释液 : 将无核酸酶的蒸馏水按1:20的比例添加至稀释液 (20×), 并充分混合。

荧光溶液 : 将1×稀释液按1:2000的比例添加至荧光试剂, 并充分混合 (用铝箔等包裹避光)。

RNA标准溶液 : 按下表所示梯度稀释RNA标准品 (100 ng/ μL), 制备各种浓度的RNA溶液 (下表仅供参考)。

标准的梯度稀释

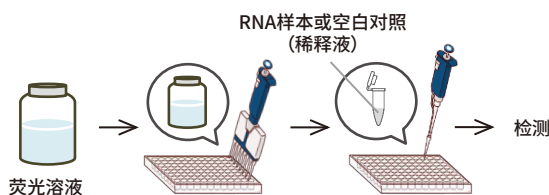
RNA标准浓度 (ng/ μL)	RNA标准溶液的体积	1×稀释液体积
100	RNA标准原液: 100 μL	-
10	100 ng/ μL 溶液: 10 μL	90 μL
5	10 ng/ μL 溶液: 50 μL	50 μL
2.5	5 ng/ μL 溶液: 50 μL	50 μL
1.25	2.5 ng/ μL 溶液: 50 μL	50 μL
0.625	1.25 ng/ μL 溶液: 50 μL	50 μL
0.3125	0.625 ng/ μL 溶液: 50 μL	50 μL
0.15625	0.3125 ng/ μL 溶液: 50 μL	50 μL

定量COLO201细胞来源EV的RNA时的梯度稀释

RNA标准品浓度 (ng/ μL)	RNA标准溶液的体积	1×稀释液体积
100	RNA标准品原液: 100 μL	-
1	100 ng/ μL 溶液: 2 μL	198 μL
0.5	10 ng/ μL 溶液: 50 μL	50 μL
0.25	5 ng/ μL 溶液: 50 μL	50 μL
0.125	2.5 ng/ μL 溶液: 50 μL	50 μL
0.0625	1.25 ng/ μL 溶液: 50 μL	50 μL
0.03125	0.625 ng/ μL 溶液: 50 μL	50 μL
0.015625	0.3125 ng/ μL 溶液: 50 μL	50 μL

2. RNA定量检测

- 2-1. 向96孔板的各孔内分注200 μL 荧光试剂溶液。
- 2-2. 向标准品孔中分注10 μL 经稀释制备的各浓度的RNA标准溶液。
空白对照中各分注10 μL 1×稀释液。
- 2-3. 向样本检测孔中各分注1-20 μL 预处理RNA样本。
- 2-4. 使用微孔板振荡器或移液枪将各孔混合液混匀
- 2-5. 避光, 室温孵育5 min
- 2-6. 使用酶标仪检测荧光 (激发光波长492 nm, 荧光波长540 nm)

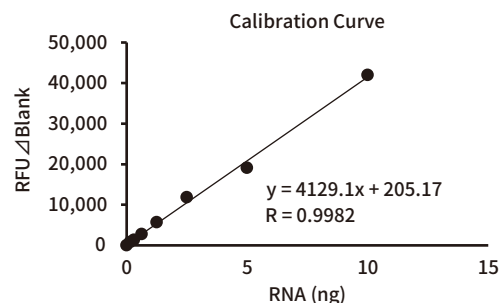


数据

▼ 定量检测纯化EV中的RNA

使用MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver.2从脐带来源间充质干细胞的细胞培养上清液中分离EV, 并使用纯化EV用RNA提取试剂盒提取总RNA。取5 μL 提取的RNA溶液, 使用本产品定量检测RNA量。结果显示, 使用本产品可对源自EV的RNA进行可靠的定量分析。

实测值 (RFU Δ Blank)	RNA量 (ng)
4,239	0.977



【结果】

使用本产品可以定量检测EV中的RNA。

产品编号	产品名称	等级	规格
297-97901	纯化EV用RNA定量试剂盒	基因研究用	1000 tests

蛋白质组学用蛋白质增溶剂

LysoPure™ Protein Extraction-PTS Solution

LysoPure™ Protein Extraction-PTS Solution是在蛋白质组学前处理步骤的蛋白提取中使用的增溶剂。该产品基于PTS方法开发,可有效溶解难溶性蛋白,同时保持消化酶的活性,并可通过液-液分配方式轻松去除增溶剂。本产品基于此前报道的PTS溶液¹⁻²⁾进行改良,相比传统的PTS溶液,它的蛋白溶解性和蛋白消化酶活性更高,而且因消化酶导致的漏切率更低。还能用于外泌体等细胞外囊泡的蛋白质组学研究。

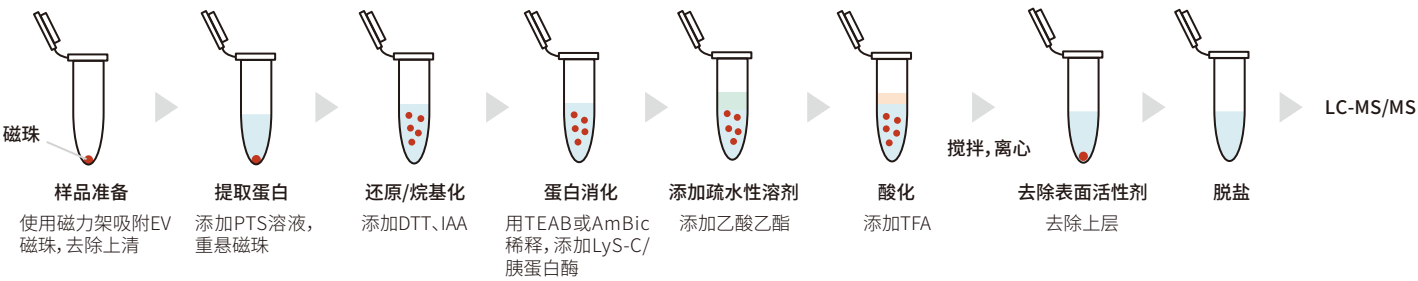
1) Masuda, T, Tomita, M. and Ishihama, Y.: J. Proteome Res., 7(2), 731(2008).
2) Masuda, T. et al.: Mol. Cell. Proteomics, 8(12), 2770(2009).

特点

- 可提取疏水性高的蛋白质,包括膜蛋白
- 不抑制消化酶活性
- 通过液-液分配方式可轻易去除增溶剂

Protocol

▼从细胞外囊泡(EV)中提取蛋白(使用MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2)



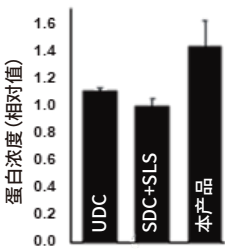
数据

▼蛋白的可溶性

使用不同的表面活性剂混合组成的各种PTS溶液, 从人肝微粒体组分中提取蛋白, 比较各实验组的蛋白浓度。

【结果】

与其他表面活性剂成分的传统PTS溶液相比, 本产品显示高可溶性。



▼蛋白消化酶活性和漏切率

PTS溶液	胰蛋白酶			赖氨酰内肽酶(Lys-C)		
	PTS溶液的浓度	活性	初速度	PTS溶液的浓度	活性	初速度
SDC+SLS	4 mM	12.6	4.4	4 mM	2.5	1.9
SDC+SC	8 mM	5.7	2.3	8 mM	2.6	2.4
SDC+CDC	8 mM	7.5	4.4	8 mM	2.4	1.8
本产品	8 mM	10.3	4.6	8 mM	2.6	1.8

PTS溶液	漏切数
UDC	586
SDC+SLS	723
SLS+SC	273
本产品	291

CDC: 鹅去氧胆酸; SC: 胆酸钠; SDC: 脱氧胆酸钠; SLS: 月桂酰肌氨酸钠; UDC: 熊去氧胆酸

【结果】

尽管SDS+SLS的胰蛋白酶活性最高, 但漏切的数量最多。相比之下, 尽管本产品在胰蛋白酶中的酶活性低于SDC+SLS, 但赖氨酰内肽酶(Lys-C)的裂解活性最高, 漏切数较低。因此, 本产品是一款酶活性高, 漏切数少, 平衡各方性能的PTS溶液。

产品编号	产品名称	等级	规格
127-07101	LysoPure™ 蛋白提取PTS溶液	基因研究用	5 mL

增强EV膜渗透性, 实现EV内部蛋白质检测

EV-Perm™ 外泌体膜渗透处理用试剂盒

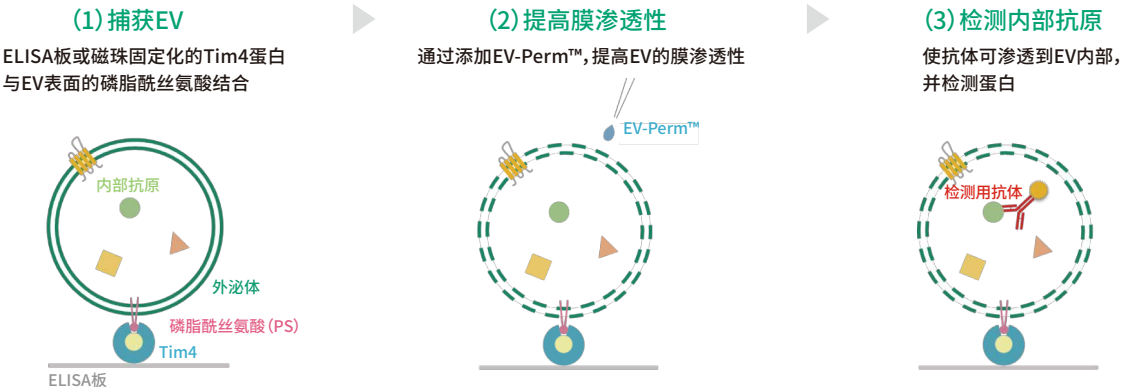
EV-Perm™ 外泌体膜渗透处理用试剂盒是一款通过提高EV的膜渗透性, 从而实现使用抗体检测存在于EV内部的蛋白质。

※ 请配合PS Capture™ 外泌体ELISA 试剂盒和PS Capture™ 外泌体流式细胞术试剂盒使用本试剂。另外, 检测抗体需单独制备。

特点

- 试剂盒的试剂 (3种) 可提高外泌体的膜渗透性
- 配合使用ELISA试剂盒和流式试剂盒, 可检测EV内部的蛋白
- 除纯化EV外, 还可用于细胞培养上清和体液样本

原理 (与PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒配合使用)



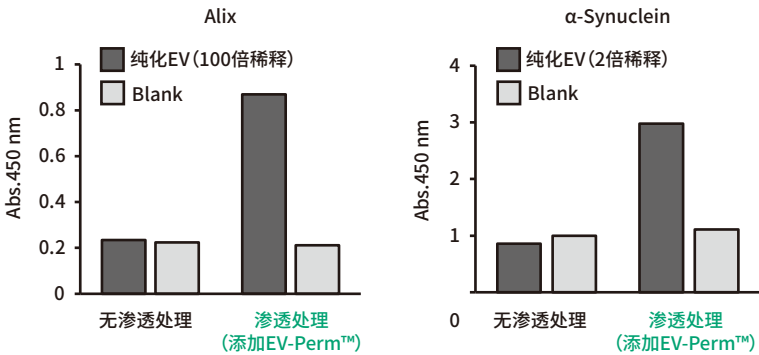
数据

使用ELISA试剂盒检测内部标志物

使用EV-Perm™ 渗透处理从HEK293T及H4细胞培养上清中纯化的EV, 并使用PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (链霉亲和素HRP) 分别检测HEK293T来源EV内部Alix和H4来源EV内部α-synuclein。

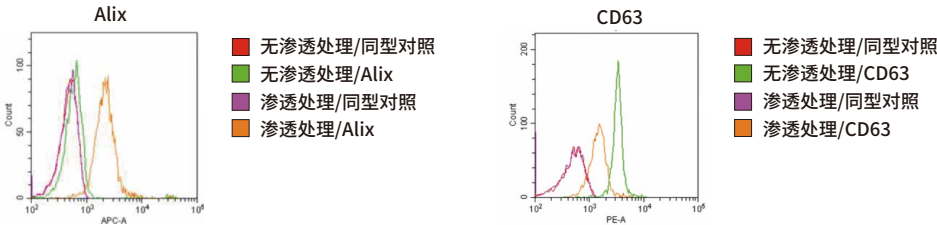
结果

经本产品渗透处理, 使用ELISA试剂盒可检测EV内部的Alix、α-synuclein。



使用流式试剂盒检测内部标志物

使用EV-Perm™ 渗透处理从HEK293T细胞培养上清中纯化的EV, 并使用PS Capture™ 外泌体流式试剂盒检测EV内部的Alix以及表面的CD63。



结果

经本产品渗透处理, 使用流式试剂盒可检测EV内部的Alix。

产品编号	产品名称	等级	规格
294-85701	EV-Perm™ 外泌体膜渗透处理用试剂盒	基因研究用	1 kit

水平连接型共培养板

UniWells™ 水平连接细胞共培养板



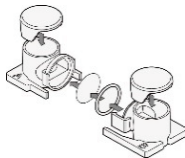
UniWells™ 水平连接共培养板是2孔水平连接的新型共培养容器。传统的共培养板都是使用上下共用培养液的细胞培养板，存在上下层培养条件不同以及无法同时观察上下层细胞的缺点。本产品为水平连接，既能在相同条件下培养细胞，还能同时观察细胞。



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
可以将分开培养的细胞自由组合拼接

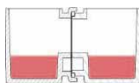
使用方法



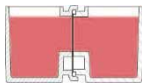
将滤膜*、O型密封环、盖子接在一起。
※滤膜需另行购买

连接方法有以下两种:

- 1) 将单独培养过的孔中的培养基引过去并连接
- 2) 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

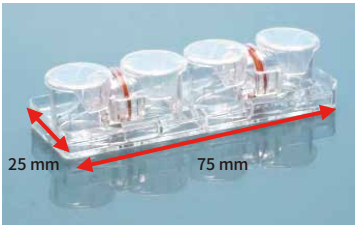
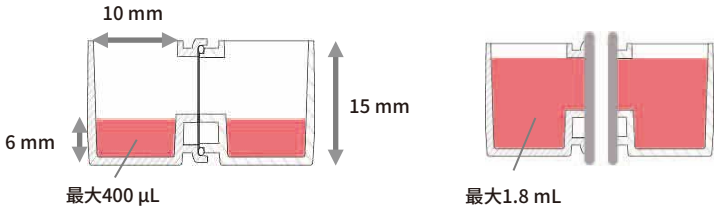


共培养状态

使用通用盖可实现单独培养。

规格

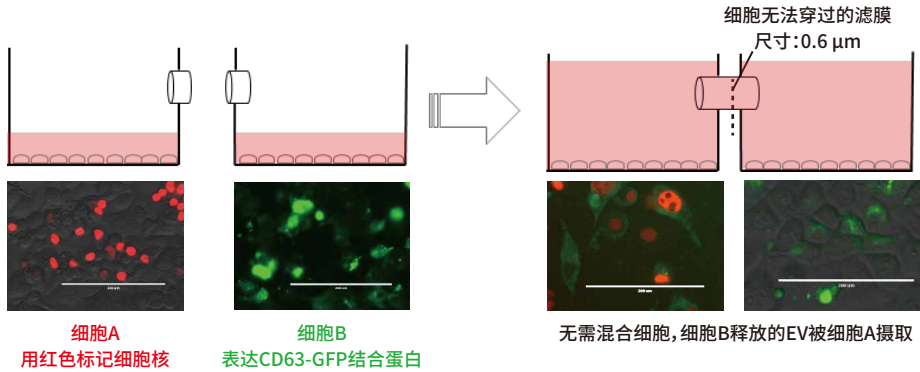
UniWells™ 本体附属的适配器与一般的载玻片大小相同。如右图所示，适配器能够并排放置两个连接后的培养容器。



数据

▼ EV摄取

使用UniWells™ 水平共培养板进行实验，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。



产品编号	产品名称	厂家	规格
384-14421	UniWells™ 水平共培养板	Ginreilab Inc.	10 set
381-14431	UniWells™ 滤膜0.03 μm		50片
388-14441	UniWells™ 滤膜0.6 μm		50片
380-19261	UniWells™ 滤膜1.2 μm		50片
388-17001	UniWells™ 共培养板96孔板适配器		1个

关于PS亲和法

Q: 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。建议使用PS亲和法和法时选用以下简单分离方法, 以获得各主要组分:

纯化外泌体等小细胞外囊泡 (Small EVs) 时, 请选用10,000×g离心后的上清液作为样品; 为纯化大细胞外囊泡 (Large EVs, 包括微囊泡), 首先收集1,200×g离心后的上清液, 然后收集其10,000×g离心后的沉淀, 用TBS悬浮后作为样品; 如果同时纯化上述两种细胞外囊泡, 请使用1,200×g离心后的上清作为样品。

Q: 除分泌体外, 是否有其他物质被分离出来?

包膜病毒也会被收集。由于PS同样暴露于包膜病毒的膜表面, 因此在包膜病毒污染的样品中, 两者均会被回收。利用这一特性, PS亲和法可被用于分离包膜病毒。以下论文报道了使用PS亲和法纯化病毒的研究:

<参考文献>

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

为了分离病毒, 在使用PS亲和法收集后, 必须使用针对该病毒的特异性抗体进行亲和纯化。这不仅适用于FUJIFILM Wako的试剂盒, 也适用于针对EV标志物 (如同样存在于包膜上CD63) 的抗体的纯化法。

Q: 所有的外泌体都会暴露PS吗?

如P4和P10所述, 使用NTA法和ELISA法比较PS亲和法纯化前后样品中所含的EV数, 结果显示, 在所有检测的细胞或体液样品中, 均可回收约90%的EV。

另外, 与超速离心法或尺寸排阻色谱法相比, 用PS亲和法纯化的EV中, 低阴离子性EV的比例更高, 而高阴离子性的EV比例更低。

Q: 与其他EV分离方法相比, PS亲和法的优势是什么?

▼超速离心法

与超速离心法相比, PS亲和法能更简便、可重复且高效地回收高纯度外泌体, 还能从不适合通过超速离心法沉淀的样品中回收外泌体。回收的外泌体纯度同样很高, 与采用超速离心法联合密度梯度离心法纯化的外泌体纯度相当。

▼聚合物沉淀法

与聚合物沉淀法相比, PS亲和法的回收率更高, 且能获得高纯度的外泌体。

▼抗体亲和法

抗体亲和法使用的是针对外泌体表面抗原的抗体, 需使用变性剂洗脱或在酸性条件下分离回收外泌体。而PS亲和法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, 磁珠上非特异性吸附的蛋白污染较低, 可高效回收高纯度的外泌体。

MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2

■ 关于样品

Q: 可以从哪些样品中纯化外泌体?

已成功从细胞培养上清液、血清、血浆 (含肝素和EDTA抗凝)、尿液及粪便中回收EV。另外, 也有用户报道了从脑脊液和唾液中成功纯化外泌体的实例。关于乳源性EV, 牛奶中存在的膜蛋白V可能与EV表面的PS结合, 从而可能抑制其与Tim4的结合。

Q: 该试剂盒适用于哪些动物?

已成功从人、小鼠、大鼠、犬和猴中分离出EV。

Q: 纯化所需的最小样品体积是多少?

为确保样品与磁珠混合均匀, 当使用旋转混合器反应时, 样品体积应至少为500 μL, 使用管式混合器时, 样品体积应至少为100 μL。若样品体积更小, 应添加TBS将其补至最低样本体积, 再与外泌体捕获包被磁珠进行反应。建议在用于补足样品的TBS中加入EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂。

Q: 可以从大体积样品中回收外泌体吗?

虽然完全回收较为困难, 但可通过浓缩处理后进行回收。细胞培养上清最多可使用50 mL。将50 mL预先离心分的细胞培养上清通过超滤浓缩至1 mL (推荐滤器: Sartorius Viva Spin20, 截留分子量100 K, 产品编号: VS2041)。不仅无血清培养基, 含有10% FBS的培养基也可使用。血清样品不可浓缩, 因此最多可使用1 mL。

Q: 超滤浓缩中推荐的截留分子量为100 K, 可以使用10 K吗?

FUJIFILM Wako测试了截留分子量为100 K、300 K、1000 K的超滤过滤器, 综合浓缩时间和外泌体浓缩量, 推荐使用100 K的过滤器。虽然截留分子量更小 (如10 K和30 K) 的过滤器也可以使用, 但可能需要更长的浓缩时间。对于含有白蛋白的培养基, 由于白蛋白被浓缩, EV的回收率可能会降低。

Q: 对于血浆 (EDTA、柠檬酸盐) 样本, 是否有推荐的肝素浓度?

FUJIFILM Wako通过添加肝素使其最终浓度达到5 mU。虽然将样品至少稀释五倍后, 不添加肝素也能检测, 但稀释过程中可能会发生凝集, 因此建议添加肝素。

■ 关于回收量

Q: 每个纯化过程能分离出多少EV?

回收的外泌体量因样品类型和体积而异, 对于经莫能菌素钠盐刺激外泌体分泌的5 mL K562细胞培养上清液浓缩至1 mL进行纯化时, 每个纯化过程可获得约30 μg/mL的蛋白 (BCA法检测), 粒子数为1-2 × 10¹⁰ particles/mL (NanoSight法测定)。另外, 从1 mL正常人混合血清中纯化时, 每个纯化过程可回收约34 μg/mL的蛋白, 粒子数约为5 × 10⁹ particles/mL。

Q: EV的最大回收量是多少?

每个纯化过程的最大回收量为1-5 × 10¹⁰ particles。

Q: 每个Biotin Capture Magnetic Beads是否只能结合一个Biotin-labeled Exosome Capture?此外, 每个固定了Exosome Capture的磁珠可以捕获多少个EV?

每个Biotin Capture Magnetic Beads可以与多个Biotin-labeled Exosome Capture结合。每个固定了Exosome Capture的磁珠只能捕获一个EV。

■ 关于试剂盒的组成与操作方法

Q: 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的螯合剂和盐类。若这些成分干扰后续分析, 请通过超滤 (Sartorius VivaSpin500, 截留分子量100 K, 产品编号: VS0141) 或凝胶过滤法, 并替换为合适的缓冲液。

Q: 本试剂盒有需要特别注意的操作吗?

- (1) 在样品与固定了Exosome Capture的磁珠反应的最后一步洗涤中, 应彻底去除洗涤液。请务必确认完全去除洗涤液后再进行洗脱步骤。
- (2) 在洗脱步骤中, 加入洗脱液后应充分重悬磁珠, 确保磁珠不发生凝集。

Q: 纯化过程中是否有某个步骤可以中断并隔天继续?

样品与固定了Exosome Capture的磁珠的反应步骤可过夜进行。

Q: 固定了Exosome Capture的磁珠可以循环利用吗?

可以。使用过的磁珠最多可重复使用4次, 用于重新捕获样品中残留的外泌体。当重复提取同一样品或无需担心交叉污染时, 该试剂盒内提供的缓冲液足以进行多达50次反应 (10 tests的试剂盒)。建议在从体积大于1 mL的样品或浓缩样品中回收外泌体时重复使用。

Q: Exosome Capture的磁珠能保存吗?

可以。重复利用外泌体洗脱后的Exosome Capture的磁珠时, 将其保存于试剂盒附带的洗涤缓冲液, 或另行配制的TBS中, 并置于冷藏条件下保存。

■ 关于产品应用

Q: 分离后的EV可用于哪些分析?

可获得完整的细胞外囊泡, 并可将其用于各种分析。

- 蛋白分析: SDS-PAGE、Western blotting、蛋白质组学分析、流式细胞术、ELISA
- 遗传分析: qPCR、微阵列、二代测序
- 粒子分析: 电镜分析, 纳米颗粒追踪分析 (NTA)
- 功能分析: *in vitro* 或 *in vivo* 给药实验

MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2

Q: 每种实验需要多少量的细胞外囊泡?

以下是内部测试结果:

实验	样品量 (示例)
电镜分析	2-4×10 ¹⁰ particles/mL
微阵列分析	COLO201: 4.6×10 ¹⁰ particles TIG3: 1.7×10 ¹⁰ particles iPSC: 1.9×10 ⁹ particles
蛋白质组学分析	纯化外泌体约1 µg
Western blotting	从100 µL洗脱液中取15 µL使用

Q: 分离的EV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。

Q: 分离的EV是否可直接添加至细胞中进行后续实验?

使用本产品分离得到的EV相比旧版试剂盒细胞毒性降低, 能够直接用于*in vitro*和*in vivo*实验。然而, 如果洗脱缓冲液中的EDTA会干扰后续实验, 则需要更换缓冲液。

MagCapture™ EV Isolation Kit PS For HTS

■ 关于样品

Q: 可以处理的样品量是多少?

使用KingFisher™ Flex (赛默飞世尔科技), 可使用96孔深孔板处理多至1 mL的样品, 使用24孔深孔板处理1至5 mL的样品。

■ 关于操作

Q: 如何最大限度地减少样品中污染物的残留?

使用KingFisher™ Flex (赛默飞世尔科技) 时, 将亲和结合和洗脱步骤设置为单独程序, 并在洗脱前更换新的吸头梳, 有助于减少样品中污染物残留。详情请参阅使用说明书。

MassivEV™ EV Purification Column PS

■ 关于操作

Q: 是否有合适的液体传输的管路推荐? 应该如何链接管路?

没有具体的推荐, 只要管路能够控制流速并承受压力即可。请使用与蠕动泵匹配的管路。管路的连接方法可参考官网。

Q: 关于细胞培养上清的前处理, 选择离心还是过滤?

选择离心还是过滤取决于实验室已有的设施、仪器和设备, 无需受样品类型或具体应用的影响。

Q: 缓冲液置换是选择凝胶过滤还是超滤?

动物给药时, 建议选择凝胶过滤。

Q: 洗脱时所获得的EV溶液体积是多少?

1 mL柱是4 mL, 5 mL柱是20 mL。

Q: 用封口膜包裹的色谱柱可以保存多久?

根据经验, 封口膜包裹的色谱柱可以保存约1.5个月。

■ 疑难解答

Q: 如何去除进入色谱柱的空气?

去除色谱柱中的空气, 请尝试以以下指定的流速, 用20%或70%的乙醇溶液冲洗色谱柱。请注意, 长时间或反复暴露于空气中会降低树脂的性能。详情请参阅使用说明书。
<流速> 1 mL色谱柱: 0.85 mL/min, 5 mL色谱柱: 4.25 mL/min

EV-Save™ 细胞外囊泡保存稳定剂

■ 关于操作

Q: 样品中应添加多少EV-Save™?

每一款EV-Save™ 产品, 均向样品中加入1/100体积的EV-Save™。

■ 关于应用

Q: 添加本产品会影响下游实验吗?

对下游实验的影响因具体的EV-Save™ 产品而异。详情请参阅FUJIFILM Wako官网。

Q: 添加了本产品后, 是否可以使用纯化EV样品进行蛋白质组学分析?

使用以下方法去除EV-Save™ 后即可进行分析:

1. 向纯化的EV样品中加入5倍体积的冷丙酮, 通过颠倒混匀
2. -20°C静置1 h
3. 1500×g, 4°C 离心10 min
4. 去除上清
5. 重复步骤1-4三次
6. 打开盖子, 静置风干1 h (室温)。
7. 溶于20 µL的9 M尿素, 20 mM HEPES-NaOH (pH 8.2) 中。

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

■ 关于性能

Q: 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, 能够更高效地捕获更广泛的EV。

■ 关于样品

Q: 检测所需的最小样品量是多少?

可以检测到相当于1 ng蛋白质的EV, 作为参考, 从COLO201细胞培养上清中纯化EV的检测下限为11 pg (检测限因细胞系而异)。

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

Q: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) 可直接检测。但PS Capture™ 外泌体ELISA试剂盒 (抗小鼠IgG POD) 不适用于直接检测血清和血浆样本, 因为该试剂盒提供的检测二抗会与人、小鼠、大鼠的IgG发生非特异性反应。

Q: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。

Q:已成功使用哪些细胞系?

以下细胞系已在内部测试中成功使用。

细胞系	来源	细胞系	来源
A549	人肺泡基底上皮腺癌	iPS	诱导多能干细胞
BxPC-3	人原发性胰腺腺癌	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C3H乳腺癌	Panc-1	人胰腺
HCT116	人结肠癌	RAJI	人伯基特淋巴瘤
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	人单核细胞白血病
HPAF II	人胰腺肿瘤	U2OS	人骨肉瘤
HuH-7	人肝细胞癌	BM-MSC	人骨髓来源间充质干细胞
HUVEC	人脐静脉内皮细胞	iCell-MSC	iPS-01279来源的间充质干细胞

Q:直接检测培养上清和体液样品时,需要多少样品?

仅需几微升 (1-5 µL) 的培养上清和体液样品即可进行检测。在分析培养基中EV量随时间的变化或检测新的细胞培养上清时, 建议使用此体积。然而不同细胞类型 (如iPS细胞等), 可能会出现培养基中EV量较少的情况。当样品中的EV量未知时, 建议通过预实验确定合适的样品体积。

■ 关于试剂盒组成

Q:为什么没有配套的标准品?

每种细胞分泌的EV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。

Q:一定要制备标准品吗?制备标准品时,是否必须使用PS亲和法吗?

定量检测时, 请制备EV作为标准品。超速离心法、聚合物沉淀法或其他方法提取的EV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EV作为标准品 (详细制备方法请参考试剂盒的使用说明书)。

Q: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, 可选择针对检测表面标记的小鼠抗体, 并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, 选择生物素标记的抗体用于检测任意表面标记, 并根据使用说明书确定最佳浓度。

■ 关于操作

Q: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。

Q:实验操作中是否有步骤可以延续到第二天?

将各样品固定在孔板的步骤可在4°C下过夜。

Q: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。

■ 疑难解答

Q:无法顺利进行检测,应该检查哪一个步骤?

请确认以下几点:

- 使用的各个试剂是否都在有效期内
- 洗涤液中是否有添加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, CD63的表达量可能低于检测下限, 或是存在其他原因。

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

Q: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, 能够更高效地捕获更广泛的EV。

Q:实验操作中是否有可以延续到第二天的步骤?

将各样品固定在孔板的步骤可在4°C下过夜。

PS Capture™ 外泌体流式试剂盒

■ 关于样品

Q:本试剂盒可以用于哪些动物?

试剂盒已用于源自人、小鼠、牛和猴的样品。

Q:检测使用的最小样品量是多少?

每份样品需要33 µL左右。但样品中所含的EV较少时, 可通过离心预处理细胞培养上清, 并采用超滤浓缩制备样品。(推荐滤器: Sartorius Vivaspın20, 截留分子量100 K, 产品编号: VS2041)

Q:如何检测已纯化的EV样品?

将纯化完成的外泌体稀释至适当的浓度后, 按照使用说明书中的第2步“细胞外囊泡的分离”进行实验。稀释纯化EV时, 请使用试剂盒附带的洗涤缓冲液 (10×), 用超纯水稀释10倍, 纯化外泌体在浓度范围为125-1000 ng/mL时可被检测到。

■ 关于试剂盒组成

Q:MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver.2适用于流式细胞术吗?

不适用。建议使用磁珠和洗涤液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。

Q:MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver.2中有磁珠和Tim4结合的步骤,为何本产品没有结合步骤?

本产品直接将Tim4与磁珠结合, 而MagCapture™ 外泌体提取试剂盒PS Ver.2则通过生物素-亲和素系统结合Tim4。由于使用的磁珠类型不同, 两者规格不同。

Q:本试剂盒中含有EV检测用的抗体吗?

本试剂盒中不含EV检测用的荧光标记抗体, 需另行购买适用的荧光标记抗体。

PS Capture™ 外泌体流式试剂盒

Q: 可以使用荧光标记二抗进行检测吗?

可以。EV分离后, 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。分别在静置20 min, 40 min, 1 h时, 将磁珠涡旋振荡约5 s。
2. 使用300 µL 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), 添加到第2步中的磁珠;
4. 室温静置1 h。期间在20 min, 40 min, 1 h时, 将磁珠涡旋振荡约5 s;
5. 使用300 µL WB (+Enhancer) 清洗3次;
6. 在300 µL WB (+Enhancer) 中重悬磁珠;
7. 使用流式细胞仪进行分析。

■ 关于应用

Q: 本试剂盒可以用于定量分析吗?

不能。定量分析需要确定每颗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

Q: 多个外泌体捕获磁珠与EV结合, 磁珠聚集怎么办?

根据前向和侧向散射光图, 设置单个磁珠群体的门, 并在门内检测外泌体捕获磁珠的荧光信号。对于典型样品, 单个磁珠群体占总体的50%-70%。此外, 使用细胞筛网可减少磁珠聚集。

Q: 磁珠未吸附在磁力架的侧面。

本试剂盒的磁珠针经过优化, 适用于流式细胞术, 且磁珠浓度较低。因此, 肉眼难以确认磁珠是否被收集。在洗涤步骤中, 将样品管静置于磁力架上至少1 min, 然后缓慢移液, 避免吸走磁珠。

抗EV标记抗体

■ 关于样品

Q: 可以用于还原条件下的样品吗?

FUJIFILM Wako的抗EV标志物抗体可识别非还原条件下的CD9、CD63和CD81, 不能用于还原条件下的样品。

■ 关于操作

Q: 在非还原条件下进行SDS-PAGE电泳时是否需要煮沸?

FUJIFILM Wako的实验中, 样品通常与不含还原剂的样品缓冲液混合, 并在95°C下加热5 min。

EV-Up™ MSC EV生产用培养基, AF / EV-Up™ MSC EV生产用添加剂, AF

■ 关于样品

Q: 除MSC以外, 是否用其他细胞类型验证过该产品?

FUJIFILM Wako已验证其在HEK293T、TIG-3和COLO201细胞的应用, 除此以外的细胞类型尚未评估。

■ 关于操作

Q: 如果需要少量培养基, 应如何操作。

请将EV-Up™ MSC EV生产用添加剂AF分装成小份并冻存。使用时, 仅解冻所需量。EV-Up™ MSC EV生产用培养基AF添加EV-Up™ MSC EV生产用添加剂AF后, 应立即使用。

本页面提供的信息摘自部分客户咨询。如需了解其他产品或有其他疑问, 请咨询FUJIFILM Wako客服。请注意, 以上信息截至发布时有效。

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.

FUJIFILM

富士胶片 and 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、3011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

