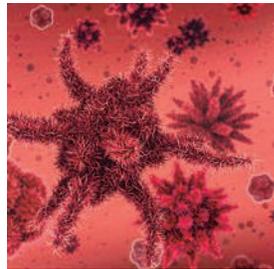
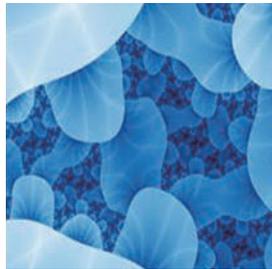
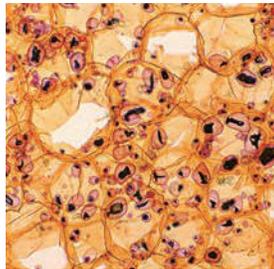
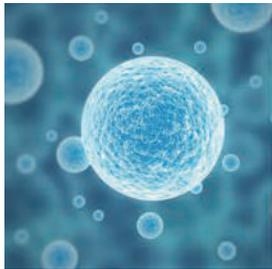


Exosomes

Research Products

外泌体富集|提取|追踪|定量|鉴定





公司简介

上海道鹏生物科技有限公司 (Shanghai XP Biomed Ltd.) 成立于2005年, 以细胞生物学为主轴, 并向蛋白质组学延伸, 致力于结合国内外先进生物技术与产品, 为广大的科研、医疗及产业界用户提供整体解决方案。

2009年, 道鹏生物正式成为以色列Biological Industries (BI) 中国市场部, 成为BI在中国 (含香港与澳门) 的独家总代理。

2012年创立VivaCell品牌, 致力于生命科学的创新研发, 投入自主生产的行列, 并开发Dr. Cell 技术服务, 提供客户更优质的创新产品, 更专业的技术支持, 以及更完善的售后服务。

2013年, 陆续引进美国Molecular Devices (多功能酶标仪及试剂盒)、美国FiberCell (中空纤维细胞培养系统)、瑞典BioLamina (Laminin 人重组层粘连蛋白)、以色列BioCep (连续流动磁珠细胞分离系统)、美国TheWell (VitroGel 3D水凝胶)、英国Cell Guidance Systems (外泌体纯化与追踪试剂) 及美国Akron (cGMP细胞因子) 等品牌在国内的总代理。

2014年引进以色列最严格的国际标准GMP生产流程。

2015年取得医疗器械生产许可证, 生产临床检验用细胞培养相关试剂。

2016年获得ISO9001以及ISO13485双重国际认证, 并拥有20余项专利, 同时获得上海高新技术企业认证。

目录

外泌体收获前的细胞培养

去外泌体血清 1

外泌体的富集

FiberCell中空纤维细胞培养系统 2-3

外泌体的提取和纯化

Exo-spin™外泌体提取试剂盒 4-5

外泌体的定量

TRIFic™外泌体荧光定量试剂盒 6

外泌体的追踪

ExoFLARE™长效外泌体追踪试剂盒 7

外泌体的鉴定

纳米颗粒追踪分析 (NTA) 8

外泌体透射电镜分析 (TEM) 9

蛋白印迹法 (Western Blot) 9

外泌体的收集

——（细胞培养阶段）去外泌体胎牛血清



在进行外泌体研究中，如果是从细胞培养上清中获取外泌体以进行后续研究，需避免使用常规胎牛血清（无血清培养系统可忽略）。因为胎牛血清中含有大量牛源外泌体，会极大程度干扰实验。

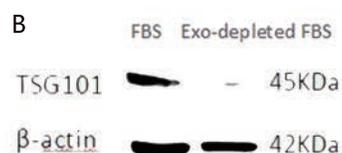
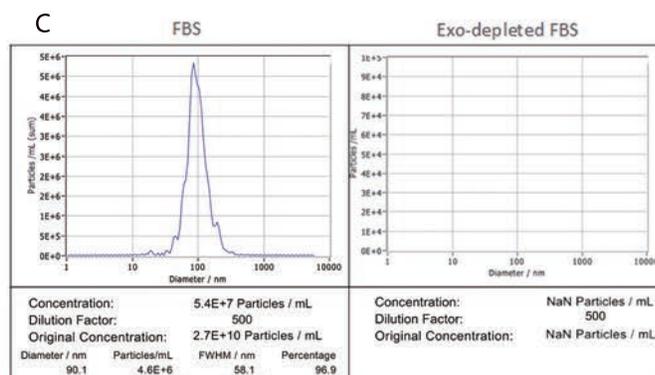
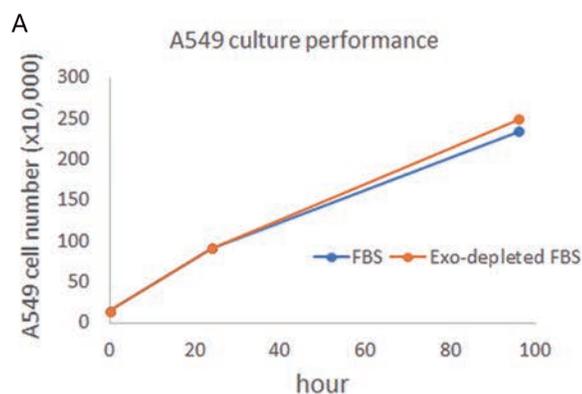
因此，建议在细胞培养过程中，使用去外泌体血清，保证后续实验的准确性。

Vivacell去外泌体血清特点

- 第二代去外泌体胎牛血清
- 符合所有GMP生产要求
- 去除≥97%的胎牛血清内源外泌体
- 与处理前的FBS具相同细胞生长速率和形态



Vivacell去外泌体血清测试数据



- A. 细胞株A549在正常胎牛血清和处理后的胎牛血清中的生长速率相同；
- B. β-actin 为内参；相比于未处理的血清，去外泌体血清的 TSG101 含量极低；
- C. NTA数据显示，去外泌体血清中已基本无可测得的外泌体颗粒。

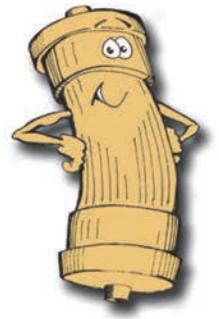
订货信息

产品货号	规格	储存条件
C38010050	50ml	-20°C
C38010100	100ml	-20°C



外泌体的富集

——FiberCell中空纤维细胞培养系统



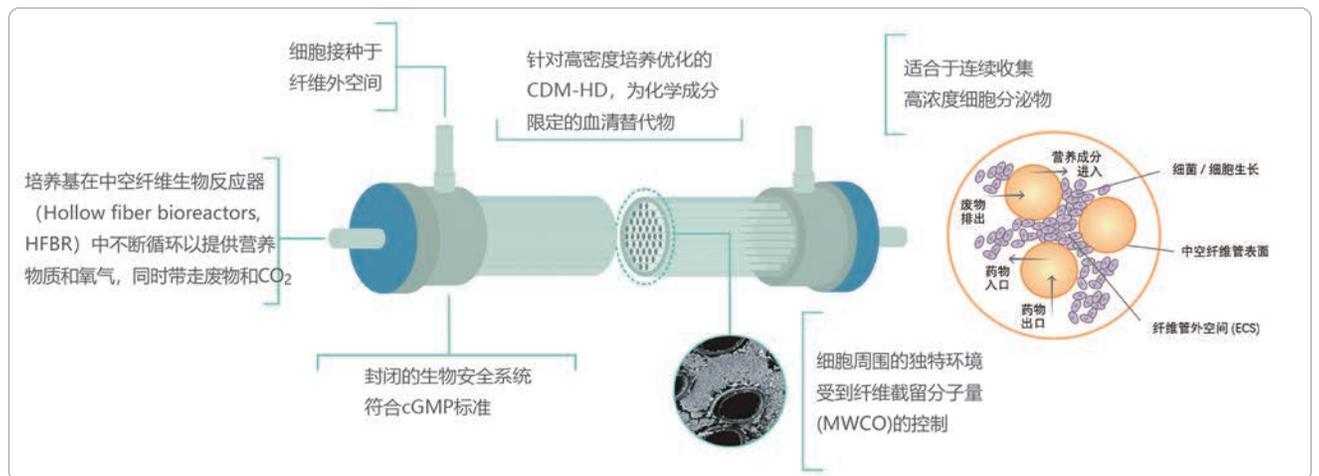
FiberCell中空纤维细胞培养系统介绍

FiberCell中空纤维细胞培养系统是美国FiberCell Systems公司的产品，应用之一即是干细胞与293细胞等生产外泌体的理想反应器。由于外泌体不能通过纤维，可收获高浓度的外泌体，并且细胞碎片显著降低。外泌体还能长时间持续收获，保持活性不变。



FiberCell工作原理

1. 蠕动泵、培养筒、培养基储液瓶通过导管连接构成一个连续流动的体系。
2. 中空纤维作用类似于微血管，纤维直径大约200 μm ，并可选择不同通透率的纤维。
3. 培养基流经中空纤维内部，而细胞培养在纤维外；在培养的细胞与流动的培养基之间形成一个半透膜的屏障。乳酸、葡萄糖等小分子可以自由穿透纤维。
4. 立体几何形纤维适用于贴壁与悬浮细胞培养。
5. 细胞生长在中空纤维外时，分泌的产物如外泌体、单克隆抗体与蛋白质等大分子聚集在小体积的ECS (Extracellular space, 纤维管外空间) 中，浓度可高于平板或滚瓶培养100倍。



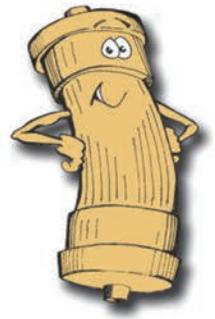
FiberCell的优势介绍

FiberCell中空纤维细胞培养密度可达到 1×10^8 /ml，高密度细胞培养具有独特的优势：

- * 在20ml中可培养至 10^9 个细胞
- * 增加细胞分泌产物浓度10-100倍
- * 不需传代，提高细胞活率，减少细胞凋亡
- * 单位时间可处理大量细胞 (高达 10^{11})
- * 产物不被血清中的外泌体污染
- * 在高密度生长条件下，细胞拥有最类似于体内细胞生长方式(most *in-vivo* like)
- * 细胞可培养8周甚至更久

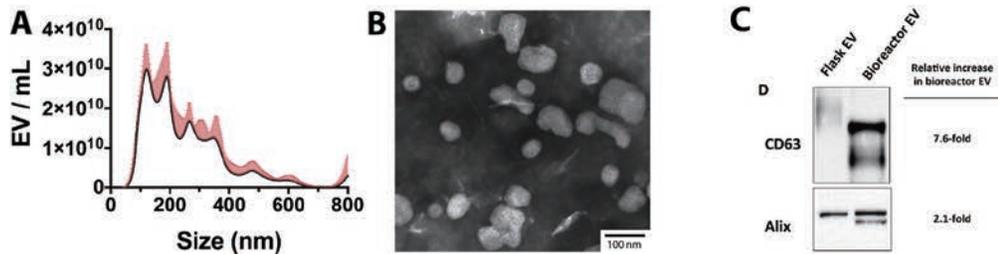
外泌体的富集

——FiberCell中空纤维细胞培养系统



FiberCell用于外泌体富集

使用培养瓶生产外泌体时，需加入血清，因而存在外源外泌体与蛋白杂质。而细胞在FiberCell系统中培养时，循环培养基中的外泌体不会进入细胞生长的空间，并且该系统也易适用于无血清环境，或使用血清替代物（CDM-HD，FiberCell）培养，从而得到高纯度与高浓度的外泌体，中型培养筒的单次收获相当于200-250个T175 flask。



中空纤维富集的外泌体，纯化后以NTA分析 (A) 和透射电镜 (B) 验证其物理特性。相较于平盘培养，中空纤维可以更有效地富集外泌体 (C)。

培养瓶及C2011中型培养筒培养MSC，收获外泌体比较				
	收获体积 (mL)	总外泌体蛋白 (mg)	总外泌体颗粒 (10^{10})	使用培养基总量 (L)
培养筒 (培养4周，收获6次)	120	14.45	326.9	7
130个T225	4000	0.9	1.6	12

2D平盘培养

5小时，处理20个T175培养瓶，
约 2×10^8 细胞量

VS

FiberCell 3D中空纤维培养

15分钟，处理1个培养筒
(20ml)，约 1×10^8 细胞量

参考文献

1. Large preparation of extracellular vesicles enriched with specific microRNA. Lu BC *et al.*, *Tissue Engineering*, 2018
2. Efficient production and enhanced tumor delivery of engineered extracellular vesicles. Watson DC *et al.*, *Biomaterials*, 2016
3. Use of a Hollow Fiber Bioreactor to Collect Extracellular Vesicles from Cells in Culture. Yan IK *et al.*, *Methods Mol Biol.*, 2018

外泌体的提取

——Exo-spin™外泌体提取试剂盒

Exo-spin™产品介绍

Exo-spin™是英国Cell Guidance Systems公司的产品，基于沉降法（precipitation）和尺寸排除色谱法（Size Exclusive Column, SEC）提取和纯化样本中的外泌体；可选择单独使用尺寸排除色谱法提取和纯化样本中的外泌体。

操作简便并且产物纯度高

不需高速离心

纯化流程温和，依样本不同耗时约30分钟-3小时

外泌体产物中蛋白和rRNA污染极低

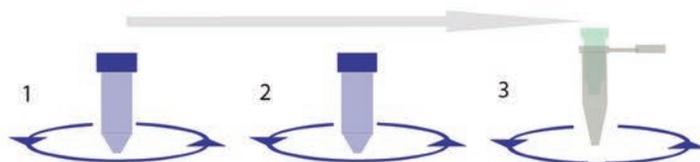
提取效果重复性高，每次纯化结果高度吻合

分离出的外泌体完好无缺，能用于功能研究、RNA及蛋白分析



Exo-spin™外泌体提取操作流程

1. 分离去除所有细胞和细胞碎片；
2. 利用产品配备的buffer分离外泌体；
3. 利用产品配备的纯化管柱进一步纯化外泌体。



Exo-spin™与其他方法的比较

	Exo-spin™外泌体纯化试剂盒	沉淀法	超速离心
产量	高	一般	一般
纯度	最高。杂蛋白被过滤管柱移除，所有的沉淀试剂在管柱过滤的步骤也都会被移除。产物只含有非常少量的rRNA污染。产物外泌体大小的分布曲线与超速离心的结果十分相似。	以沉降试剂将外泌体和杂蛋白一起沉降，但此方法并没有包含将试剂及蛋白沉淀移除的步骤。产物含有大量的rRNA污染。产物外泌体大小的分布曲线与超速离心的结果不相似。	高纯度，但产物内有大量的rRNA污染。
耗时	依样本不同可能耗时30分钟~3小时。血清样本的纯化时间少于30分钟。	依样本不同可能耗时30分钟~隔夜。	极长，需要隔夜。
成本	对体积大或是小的样本而言，成本都是较低的。	对于体积大的样本而言成本高，对于体积小样本而言成本低。	设备成本极高。

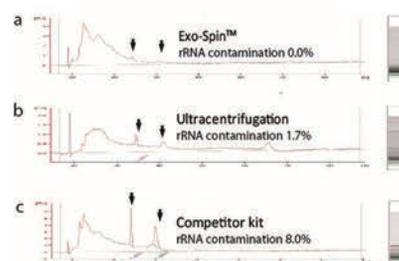
外泌体的提取

——Exo-spin™外泌体提取试剂盒

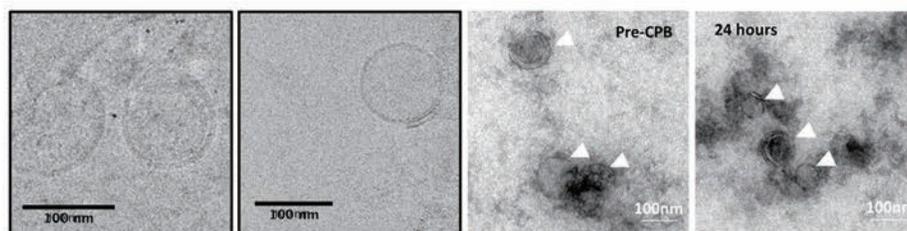
高纯度

- (a) Exo-spin试剂盒
- (b) 超速离心
- (c) 其他品牌试剂盒

Exo-spin试剂盒分离出的产物中rRNA污染含量极低。



透射电镜图例



左图1, 2: 血浆来源外泌体的冷冻电镜图 (使用Exo-spin Cat: EX02-8提取), 文献来源: 参考文献1 (下方)
左图3, 4: 血浆来源外泌体的透射电镜图 (使用Exo-spin Cat: EX03-8提取), 文献来源: 参考文献2 (下方)

参考文献

1. Size-exclusion chromatography as a stand-alone methodology identifies novel markers in mass spectrometry analyses of plasma-derived vesicles from healthy individuals Armando de Menezes-Neto *et al.*, *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015, 4: 27378
2. Coronary Artery-Bypass-Graft Surgery Increases the Plasma Concentration of Exosomes Carrying a Cargo of Cardiac MicroRNAs: An Example of Exosome Trafficking Out of the Human Heart with Potential for Cardiac Biomarker Discovery. Costanza E. *et al.*, *PLOS ONE* 2016;11(4): e0154274.
3. Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson' s disease treatment. Kojima R *et al.*, *Nature Communications* 2018;9:1305.
4. Breast cancer cell-derived exosomes and macrophage polarization are associated with lymph node metastasis. Piao YJ *et al.*, *Oncotarget* 2018; 9(7): 7398-7410.
5. A fires novel report of exosomal electrochemical sensor for sensing micro RNAs by using multi covalent attachment p19 with high sensitivity. Ghazizadeha E *et al.*, *Biosensors and Bioelectronic* 2018; 113:74-81.
6. Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. Soares Martins T *et al.*, *PLOS ONE* 2018; 13(6): e0198820.

订货信息

产品货号	样本来源	上样量	规格
EX01-8/25/25L/50	细胞培养上清液/尿液/唾液等体液	≤50ml	8/24/24/48管
EX02-8/25/50	血浆	≤0.25ml	8/24/48管
	血清/脑脊液	≤0.5ml	
EX03-8/25/50	通用	-	8/24/48管
EX04-5/20	血浆/血清	≤1ml	5/20管
	其他	≤500ml	
EX06-30	其他	-	30ml
EX06-250	其他	-	250ml

*上样量指每个column的起始上样量;

* 选购指南可参考封底内页, 或来电咨询。

外泌体的定量

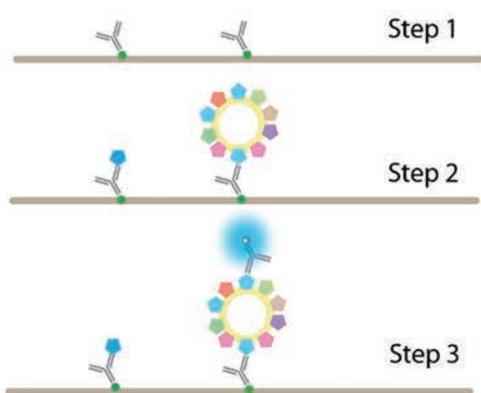
——TRIFic™ 外泌体荧光定量试剂盒

TRIFic™ 产品介绍

TRIFic™是英国Cell Guidance Systems公司的产品。TRIFic™利用铕荧光时间分辨免疫测定法，可精准定量未纯化样本中的外泌体。目前只适用于人来源样本的研究。



TRIFic™ 作用原理介绍



第一步

生物素化(Biotinylated)的抗体附着于链霉亲和(streptavidin)涂层板上。

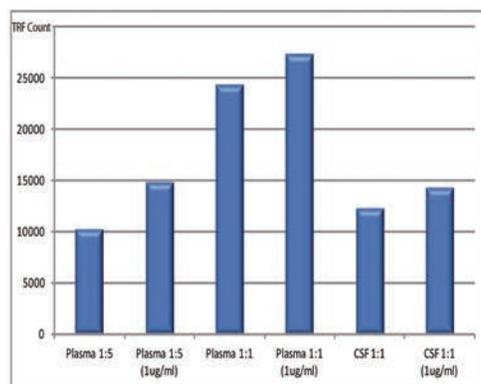
第二步

加入样本。外泌体及其他样本中的抗原(CD9/CD63/CD81)被抗体捕捉。

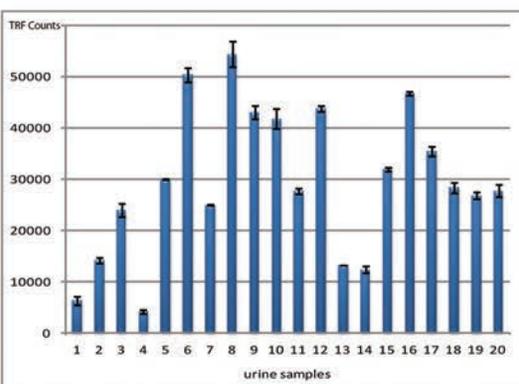
第三步

加入铕标记的抗体。铕标记的抗体有特异性，会与外泌体上的抗原结合；已经被第二步加入的抗体占据的单体表位不会被检测到；以时间分辨荧光分析仪观察结果。

TRIFic™ 应用结果展示



低浓度的外泌体分别加入稀释倍率不同的血浆或脑脊液中。在样本的背景干扰下仍能精确的检测到1µg/ml的外泌体。



利用TRIFic试验检测到20个尿液样本中的外泌体CD9表达蛋白含量存在大小不一的差异。

可测定

- 血浆
- 培养基
- 尿液
- 其他生物性液体

订货信息

产品货号	说明	规格
EX101	CD9表达蛋白使用	96 assays
EX102	CD63表达蛋白使用	96 assays
EX103	CD81表达蛋白使用	96 assays

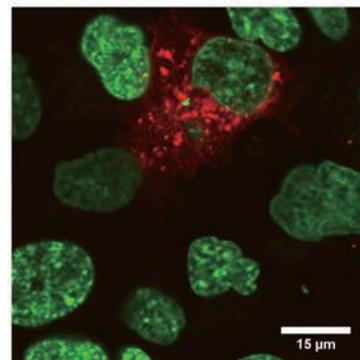
外泌体的追踪

—ExoFLARE™ 长效外泌体追踪试剂盒

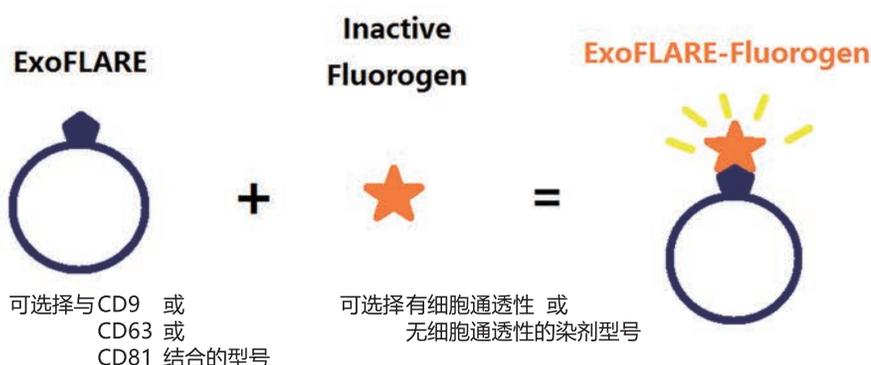
ExoFLARE™ 产品介绍

ExoFLARE™是英国Cell Guidance Systems公司的产品。该产品可将外泌体染色，特别适用于外泌体与细胞共培养的研究，能够分辨外泌体来自供细胞(donor)或受体细胞(recipient)。目前只适用于人来源细胞的研究。

ExoFLARE™ 作用原理介绍



ExoFLARE CD81蛋白标记物转染至DU145N细胞，在激光共聚焦显微镜下所观察到的图片。绿色为Hoechst核染色，红色为本产品荧光。



ExoFLARE是能活化荧光染剂(Fluorogen)的蛋白标记物，只有在ExoFLARE与荧光染剂结合的时候才能观察到荧光。结合后ExoFLARE持续刺激荧光染剂，以长时间维持荧光亮度及低背景干扰。



订货信息

产品规格	说明	规格
EX301	与CD9表达蛋白结合，无细胞通透性	20μg
EX302	与CD63表达蛋白结合，无细胞通透性	20μg
EX303	与CD81表达蛋白结合，无细胞通透性	20μg
EX304	与CD9表达蛋白结合，有细胞通透性	20μg
EX305	与CD63表达蛋白结合，有细胞通透性	20μg
EX306	与CD81表达蛋白结合，有细胞通透性	20μg

* 100次反应适用于1个96孔盘
* 本品不含转染用试剂

外泌体的鉴定

——纳米颗粒追踪分析和透射电镜分析



外泌体的鉴定大致可通过以下几种方法进行：

1. 粒径检测：目前普遍认为，外泌体的粒径在30-150nm之间，所以通过对外泌体样本进行粒径检测可初步判断所提取到的内含物是否为外泌体；相对于其他的方法，粒径检测对于样本准备最为便捷，且获取结果速度最快。现主要用纳米颗粒追踪分析法（Nanoparticles Tracking Analysis, NTA）进行检测，该技术基于布朗运动，通过视频分析颗粒计数，可同时获取样本中颗粒的粒径和绝对浓度。

2. 透射电镜检测：通过直观地观察形态判断（也有冷冻电镜报道）。

3. Western Blot：因为外泌体具有高度表达或特异性表达的蛋白，较多使用的检测指标有：CD63、Tsg101、CD9、CD81、Alix、HSP70、flotillin 和Syntenin 等，具体如何选择可参考几个外泌体数据库：exoRBase、EVpedia、Vesiclepedia和ExoCarta。

上述三种为现较成熟的鉴定手段，目前也存在其他方法，在此不做叙述。

纳米颗粒追踪分析 (NTA)

检测平台：德国PMX 纳米颗粒跟踪分析仪Zetaview

- 样本要求：**
1. 外泌体经提取处理后可直接送样检测，无需额外处理；
 2. 样本避免多次反复冻融，4°C或干冰寄送（实验室位于上海，远途建议干冰运输）；
 3. 因检测所需要样本量与样本本身浓度有关，所以无法准确建议送样量，请提供至少30微升。

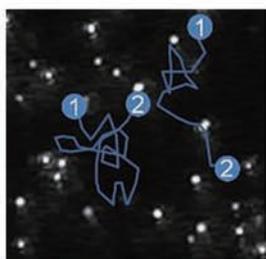
检测结果： pdf检测报告；
原始数据；
视频（以上均以电子档形式发送）

检测速度： 1-3个工作日内可出具检测数据

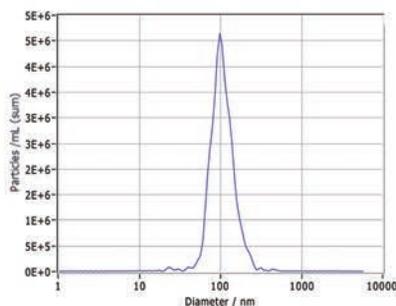
- 其他说明：**
1. 本仪器除正常模式下的粒径浓度检测，还配备488nm激光器，可进行荧光样本检测（远途须考虑荧光淬灭情况）；
 2. 本仪器另具备Zeta电位检测功能，通过表面电荷大小可评估样本内含物的稳定性。
 3. 更多检测报告内容和检测须知可扫描道鹏微信公众号（封底）进入FAQ查看。



Zetaview图片展示



软件捕捉样本中颗粒的布朗运动轨迹



外泌体样本中的颗粒粒径分布-浓度图

样本来源：血清
提取方法：Exo-spin试剂盒
浓度：1.2e11 particles/ml
粒径：100nm

外泌体的鉴定

——纳米颗粒追踪分析和透射电镜分析



透射电镜分析 (TEM)

检测平台: Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN

样本要求: 1. 样本避免多次反复冻融, 4°C或干冰寄送 (实验室位于上海, 长途建议干冰运输);
2. 请提供20-30微升;

检测结果: 三张透射电镜图片, 尽可能体现完整的外泌体形态 (如有);

检测周期: 5-10个工作日;

蛋白印迹法 (Western Blot)

以下为英国Cell Guidance Systems相应配套产品。

产品货号	说明	规格
EX201-100	CD9 Clone CGS12A mAb	100µg
EX202-100	CD63 Clone CGS73B mAb	100µg
EX203-100	CD63 Clone CGS82X mAb	100µg
EX204-100	CD81 Clone CGS36K mAb	100µg
EX205	Kit: CD9, CD63 Clone CGS82X and CD81	20µg each

Exo-Spin系列选购指南

应用 样本种类	RNA研究	质谱分析	抗体相关试验, 如Western blotting, ELISA	纳米粒子追踪分析 (NTA)	功能研究
细胞培养基 (1 ml - 50 ml)	EX01	N/A (见note)	EX01	EX01	EX01
细胞培养基 (50 ml - 500 ml)	EX04, EX06	N/A (见note)	EX04, EX06	EX04, EX06	EX04, EX06
含高浓度外泌体的细胞培养基 (最多1 ml) (见note 1)	EX03 (最高上样量: 0.1 ml) 或EX04 (最高上样量: 1 ml) (见note)				
唾液、尿液或低蛋白体液 (1 ml - 50 ml)	EX01	N/A (见note)	EX01	EX01	EX01
唾液、尿液或低蛋白体液 (50 ml - 500 ml)	EX04	N/A (见note)	EX04	EX04	EX04
血清 (上样量最多0.5 ml)	EX02	EX03 (最高上样量: 0.1 ml) (见note)	EX02	EX02	EX02
血浆 (上样量最多0.25 ml)	EX02	N/A	EX02	EX02	EX02
血清或血浆 (1 ml)	EX04	EX04	EX04	EX04	EX04

* 沉淀剂会影响质谱分析, 因此样本处理应避免使用沉淀剂, 可直接使用纯化管柱。