

EasySep™细胞外囊泡 PE 正选试剂盒

可处理 20 mL 生物液体或条件培养基

产品号 #100-0812

正选

文档号 #1000035735 | 版本00



Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

电话: 400 885 9050

E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM

产品介绍

通过免疫磁珠正选, 从血浆、血清、尿液和细胞培养条件培养基中分离出PE (phycoerythrin) 偶联抗体标记的人细胞外囊泡 (EVs)。

- 操作简单、快捷
- 无需分离柱

该试剂盒针对标记有PE偶联抗体 (需自备) 的EVs进行正选。目的EV用抗体和磁珠标记, 并通过EasySep™磁极进行无柱分选。不需要的组分通过倾倒入弃去, 而目的EVs则保留在试管中。进行正选后, **不会去除EVs上的磁珠**。最终分离的组分中含有高纯度的EV, 可立即用于下游应用, 例如DNA/RNA提取、western blot或质谱分析。

包含组分

组分名称	组分号#	规格	储存方式	效期	成分
EasySep™细胞外囊泡PE正选抗体混合物	300 - 0443	1 x 1 mL	2 - 8°C 储存。 勿冷冻	具体效期请见标签	保存在含0.1% BSA的PBS中的单克隆抗体混合物。
EasySep™ Releasable RapidSpheres™ 50201磁珠	50201	4 x 1 mL	2 - 8°C 储存。 勿冷冻	具体效期请见标签	保存在水中的磁珠悬浮液。

BSA - 牛血清白蛋白; PBS - 磷酸盐缓冲液

试剂盒组分可在室温 (15 - 25°C) 下运输, 但应按照上述说明进行储存。

样本制备

有关可用的新鲜和冻存样本, 请参见 www.stemcell.com/primarycells。

血浆 (来自全血)

1. 将全血以2000 x g离心10分钟。吸取血浆层并转移至锥形管 (例如产品号 #38009/38010)。
2. 将步骤1得到的血浆层以2000 x g离心10分钟。吸取血浆上清液并转移至新的锥形管中。
3. 将血浆上清液以10,000 x g离心30分钟, 以去除细胞碎片和大囊泡。吸取血浆上清液并转移至所需的试管或孔板中 (参见表1 - 2)。
可选: 如需要, 可以在分选EV之前使用0.2 µm滤器过滤血浆。

对于其它生物液体 (尿液除外), 请按照条件培养基的处理方法 (步骤2 - 3) 去除细胞和大囊泡。

条件培养基

1. 收集条件培养基并转移至锥形管 (例如产品号 #38009/38010)。
2. 将条件培养基以2000 x g离心10分钟。吸取上清液并转移至新的锥形管中。
3. 将上清液以10,000 x g离心30分钟。吸取上清液并转移至所需的试管或孔板中 (参见表1 - 2)。
4. 可选: 如果使用稀释的样本, 请使用30K或100K离心过滤管 (例如PALL产品号 #MAP030C36/MAP100C36) 进行浓缩。
5. 可选: 如需要, 可以在分选EV之前使用0.2 µm滤器过滤上清液。

尿液

如果使用冻存的尿液，请在样本处理之前完全解冻。

1. 涡旋尿液以得到均匀的悬液。
2. 将尿液在室温 (15 - 25°C) 下以1000 x g离心10分钟。吸取上清液并转移至新的试管中。
注：对于新鲜尿液，建议添加蛋白酶抑制剂以防止蛋白降解。
注：如不立即使用，请将尿液冷冻在-20°C以长期保存。
3. 可选（推荐）：将上清液在室温下以10,000 x g离心30分钟，以预纯化样本。
注：此步骤可减少THP污染，但可能会降低最终的EV回收率。
4. 对于 ≤ 2 mL的样本，吸取上清液并转移至所需的试管或孔板中（参见表 1 - 2），或者对于 > 2 - 20 mL的样本，将尿液转移至100K离心过滤管以浓缩样本。在室温下，以1000 x g离心30分钟。收集滤膜上方浓缩的部分并转移至所需的试管中（参见表 1）。用推荐缓冲液定容至1 mL。

推荐缓冲液

D - PBS（不含Ca⁺⁺和Mg⁺⁺；产品号 #37350）。

使用指南–EasySep™手动实验流程

请参阅第1页和第2页了解样本制备和推荐缓冲液。有关每种磁极的详细信息，请参阅表1至表2。

表1. EasySep™细胞外囊泡PE正选试剂盒操作流程

步骤	说明	EASYSEP™ 磁极	
		 EasySep™ (产品号 #18000)	 “The Big Easy” (产品号 #18001)
1	制备样本，样本体积在范围内。	0.5 - 2 mL	1 - 8 mL
	将样本添加到所需的试管中。	5 mL (12 x 75 mm) 聚苯乙烯流式管 (如: 产品号 #38007)	14 mL (17 x 95 mm) 聚苯乙烯流式管 (如: 产品号 #38008)
2	将PE偶联抗体添加到样本中。	1 µg/mL样本 注: 如样本 < 0.5 mL, 加入0.5 µg抗体。	1 µg/mL样本
	混匀并孵育。	室温孵育15分钟	室温孵育15分钟
3	在样本中加入分选抗体混合物。	50 µL/mL 样本	50 µL/mL 样本
	注意: 不要涡旋抗体混合物。 混匀并孵育。	注: 如样本 < 0.5 mL, 加入25 µL抗体混合物。 室温孵育3分钟	室温孵育3分钟
4	涡旋Releasable RapidSpheres™磁珠。 注意: 磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	30 秒
5	将Releasable RapidSpheres™磁珠加到样本中。	200 µL/mL 样本 注: 对于 < 0.5 mL的样本, 添加100 µL RapidSpheres™磁珠	200 µL/mL 样本
	混匀并孵育。	室温孵育3分钟	室温孵育3分钟
6	添加推荐的缓冲液, 将样本定容至指定体积。 通过轻轻上下吹吸2 - 3次来混匀。	定容至2.5 mL	<ul style="list-style-type: none"> ●若样本 < 4 mL, 定容至 5 mL ●若样本 ≥ 4 mL, 定容至 10 mL
	将试管 (不加盖) 放入磁极中并孵育。	室温孵育5分钟	室温孵育5分钟
7	拿起磁极, 以一个连续的动作翻转磁极和试管*, 倾倒入上清液。 注意: 倾倒入后请勿将试管从磁极中取出。 直接进行后续分选步骤。	弃去上清液	弃去上清液
8	添加推荐的缓冲液, 将样本定容至指定体积。 通过轻轻上下吹吸2 - 3次来混匀。	定容至2.5 mL	<ul style="list-style-type: none"> ●若样本 < 4 mL, 定容至 5 mL ●若样本 ≥ 4 mL, 定容至 10 mL
	孵育。	室温孵育1分钟	室温孵育1分钟
9	拿起磁极, 以一个连续的动作翻转磁极和试管*, 倾倒入上清液。 注意: 倾倒入后请勿将试管从磁极中取出。 直接进行后续分选步骤。	弃去上清液 注: 如果起始样本是条件培养基, 请跳至步骤11	弃去上清液 注: 如果起始样本是条件培养基, 请跳至步骤11
10	重复以上步骤。	再重复两次步骤8和9 (总共进行1次5分钟和3次1分钟的分选)	再重复两次步骤8和9 (总共进行1次5分钟和3次1分钟的分选)
11	从磁极中取出试管。将EVs重悬于所需培养基中。 请确保从试管壁上收集EV。	分选后的EV可立即用于下游应用	分选后的EV可立即用于下游应用

RT - 室温 (15 - 25°C)

* 保持磁极和流式管倒置 2 - 3秒, 然后恢复直立。不要摇晃或擦拭掉仍可能挂在管口的任何液滴。

表2. EasySep™细胞外囊泡PE正选试剂盒操作流程

步骤	说明	EasyPlate™ (产品号 #18102)	
1	将样本添加到所需的96孔板中。	0.2 mL	
2	将PE偶联抗体添加到样本中。	1 µg/mL样本 注: 如样本 < 0.2 mL, 加入0.2 µg抗体。	
	混匀并孵育。	室温孵育15分钟	
3	在样本中加入分选抗体混合物。 注意: 不要涡旋抗体混合物。	50 µL/mL 样本 注: 如样本 < 0.2 mL, 添加10 µL抗体混合物	
	混匀并孵育。	室温孵育3分钟	
4	涡旋振荡RapidSpheres™磁珠。 注意: 磁珠应呈均匀分散状态。	30 秒	
5	将Releasable RapidSpheres™磁珠加到样本中。	200 µL/mL 样本 注: 对于 < 0.2 mL的样本, 添加40 µL RapidSpheres™磁珠	
	混匀并孵育。	室温孵育3分钟	
6	添加推荐的缓冲液, 将样本定容至指定体积。 通过轻轻上下吹吸2 - 3次来混匀。	定容至0.2 mL	
	将孔板 (不加盖) 放入磁极中并孵育。	室温孵育5分钟	
7	小心地吸取 (切勿倾倒) 上清液。 注意: 请勿将孔板从磁极中取出。直接进行后续分选步骤。	弃去上清液	
8	添加推荐的缓冲液, 将样本定容至指定体积。 通过轻轻上下吹吸2 - 3次来混匀。	定容至0.2 mL	
	孵育。	室温孵育1分钟	
9	小心地吸取 (切勿倾倒) 上清液。 注意: 请勿将孔板从磁极中取出。直接进行后续分选步骤。	弃去上清液 注: 如果起始样本是条件培养基, 请跳至步骤11	
10	重复以上步骤。	再重复两次步骤8和9 (总共进行1次5分钟和3次1分钟的分选)	
11	从磁极中取出孔板。将EVs重悬于所需培养基中。	分选后的EVs可立即用于下游应用	

RT - 室温 (15 - 25°C)

注意事项和提示

若要通过western blot免疫染色评估CD63、CD81和CD9四跨膜蛋白标志物表达, 请使用细胞外囊泡人CD9/CD63/CD81抗体组合 (产品号 #100-0211) 或以下抗体克隆:

- 抗人CD9抗体, 克隆HI9A (产品号 #100-0138), 以及
- 抗人CD63抗体, 克隆H5C6 (产品号 #100-0139), 以及
- 抗人CD81 (TAPA-1) 抗体, 克隆5A6 (产品号 #100-0209)

有关更多信息, 请访问www.stemcell.com查看实验方法: 如何通过Western Blotting鉴定细胞外囊泡。

生物液体样本间差异

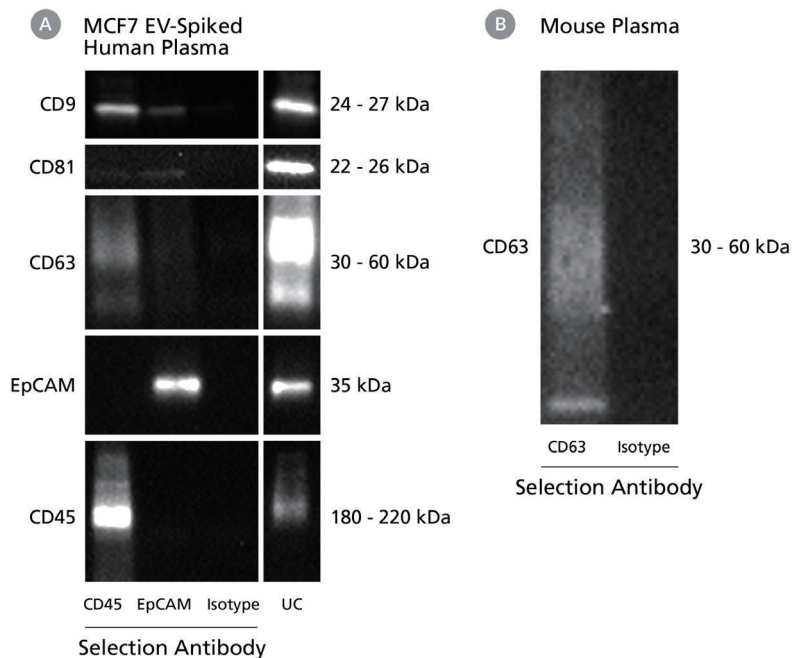
不同生物液体样本 (包括相同类型的不同样本和不同类型样本) 中EV上表达的四跨膜蛋白类型和表达量可能不同。这可能会影响后续得率和四跨膜蛋白数据的分析。

优化回收率

如需提高EV回收率, 请使用以下任一方法:

- 将一抗的孵育时间增加至30分钟, 和/或
- 将一抗、分选抗体混合物和RapidSpheres™磁珠的体积加倍
注意: 所有三种组分的体积必须同时增加。
- 对于 < 2 mL的样本, 建议使用EasySep™磁极 (产品号 #18000)。

实验数据



- (A) 通过差速超速离心 (UC) 从含有癌细胞 (MCF7) 来源EVs的健康人血浆中分离EVs, 或使用以下PE偶联抗体搭配EasySep™细胞外囊泡PE正选试剂盒: 抗人CD45抗体, 克隆HI30 (产品号 #60018PE); 抗人EpCAM抗体, 克隆9C4; 小鼠IgG1, kappa同型对照 (Isotype Control) 抗体, 克隆MOPC - 21 (产品号 #60070PE)。在非还原条件下通过western blot分析靶向标志物 (EpCAM和CD45) 和通用EV标志物 (CD9、CD81 和 CD63)。
- (B) 使用PE偶联的抗小鼠CD63抗体, 克隆NVG - 2或PE偶联的大鼠 IgG2a同型对照 (Isotype Control) 抗体搭配EasySep™细胞外囊泡PE正选试剂盒从小鼠血浆中分离EVs。在非还原条件下通过western blot分析靶向标志物 (CD63)。

产品仅供研究使用。除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。若想了解更多关于产品质量和合规的信息, 请访问WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE。

版权所有© STEMCELL Technologies Inc. 2025。保留一切权利, 包括图形和图像。STEMCELL Technologies及其设计及徽标, 以及Scientists Helping Scientists、EasyPlate、EasySep和RapidSpheres均是STEMCELL Technologies Canada Inc.的商标。所有商标均为各自所有者所有。STEMCELL尽力确保STEMCELL及其供应商提供的信息正确无误, 但对此类信息的准确性或完整性不作任何保证或声明。