

产品使用说明书

人总外泌体捕获和定量试剂盒

细胞培养上清

Human Total Exosome Capture & Quantification Kit

for cell cuLture media

Cat.# RGEXOC96-1

辽宁润基生物科技有限公司

Liaoning Rengen Biosciences Co.,Ltd.

Version2.0

01/01/2020

目录

保存和应用.....	2
产品介绍.....	3
试剂盒组成和说明.....	4
操作方法.....	5
相关产品信息.....	9
常见问题.....	9
技术支持.....	12

保存与应用

【保存条件】

本试剂盒低温下运输，收到后请按照**试剂盒不同成分分别保存**，保存期一年，一旦开封使用后，可保存一个月。使用前请详细阅读说明书。

【应用范围】

- 1、不需要样品纯化，细胞培养上清事先需要富集或浓缩（如超速离心，聚合物沉淀，树脂浓缩等），然后加样检测（100 μ L/孔）。
- 2、可用来相对或绝对定量样本中外泌体数量。
- 3、捕获的外泌体适用于核酸表达谱或蛋白质质谱分析。
- 4、适用于病理条件下，非侵入检测样本中多种生物标志物的表达变化。

本产品只适用于科学研究，不能用于临床诊断。

产品介绍

外泌体 (Exosome) 是由不同细胞分泌的直径 30-150nm 的胞外囊泡 (Extracellular Vesicles, EVs)。外泌体普遍存在于多种体液中, 包含亲代细胞的多种遗传信息, 其内容物丰富, 包括蛋白质、脂质和核酸等, 外泌体的组成和数量直接反映母细胞的状态, 尤其是肿瘤细胞分泌的外泌体, 不仅含有肿瘤细胞的特征 (如 DNA 突变、microRNA 的异常表达和肿瘤相关抗原的表达等), 并且还可以进入血液循环。因此, 可以作为除了循环肿瘤细胞 (CTCs) 外的液体活检的另一种选择。

总外泌体捕获和定量试剂盒, 可以定量或定性检测不同生物标本的外泌体, 不仅适合于细胞培养上清, 同时也适合于各种体液, 如血清、血浆、尿液、唾液等, 为后续外泌体蛋白质或核酸分析提供基础。本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术, 特异性抗人总外泌体相关抗原的单克隆抗体(捕获抗体)包被酶标板上, 可直接捕获样品和标准品中外泌体, 然后加入 Biotin 标记的检测抗体, 洗涤去除未结合的物质后, 加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (Streptavidin-HRP), 洗涤后, 加入显色底物 TMB, 避光显色。颜色反应深浅与样本中外泌体相关抗原的浓度成正比, 与外泌体的数量成正比。加入终止液终止反应, 在 450nm 波长测定吸光度值, 通过标准曲线可测定样本中外泌体的浓度。

【注意事项】

1. 本试剂盒只用于科学研究, 不能用于临床诊断。
2. 在本试剂盒标记的有效期内使用, 试剂不能与其它批号的试剂或其它来源的试剂混合使用。
3. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温(15-25°C)平衡 15-30 分钟后方可使用。
4. 洗涤液为浓缩液 (10×), 使用时根据用量, 用蒸馏水或去离子水稀释成 1×工作液。浓缩洗涤液可能会有结晶析出, 稀释前需在水浴 (37°C) 中完全溶解, 混匀。所有试剂在使用前需要混匀。
5. 冻干的标准品用 1mL 去离子水稀释, 在每次样本测定时要同时做标准曲线, 如果待测物质含量过高 (样本 OD 值大于标准品孔第 1 孔的 OD 值), 用样品稀

释液稀释一定倍数后重新测定，最后计算外泌体浓度时乘以总稀释倍数。

6.检测抗体用样本稀释液稀释 **500** 倍，HRP 标记的链霉亲和素用样本稀释液稀释 **1000** 倍。

7.阳性对照为外泌体标准品中最高浓度，阴性对照为样本稀释液。

试剂盒组成和说明

包装规格：96 人份/盒，标本类型：细胞培养上清

产品组成 Cat.# RGEXOC96-1	容量	保存条件
样本稀释液 (Sample Dilution Buffer)	30mL	2-8°C
10×洗涤液 (Washing Buffer,10×)	50mL	2-8°C
显色底物 A 液 (Substrate Solution A)	6mL	2-8°C
显色底物 B 液 (Substrate Solution B)	6mL	2-8°C
终止液 (Stop Solution)	6mL	2-8°C
预包被酶标板 (Pre-coated Immunoplate)	8×12 孔	2-8°C
外泌体标准品 (Exosome Standard)	1 瓶(3.9×10^{10})	2-8°C
检测抗体 (Detection Antibody Biotin Conjugated)	22μL	2-8°C
HRP 标记的链霉亲和素 (Streptavidin HRP Conjugated)	12μL	2-8°C
封板膜 (Sealing Film)	2 张	RT

【需准备的其它试剂和设备】

- 1、去离子水。
- 2、配试剂用的离心管、试管和量筒等。
- 3、移液器及枪头。
- 4、酶标仪和温度培养箱 (37°C)。

操作方法

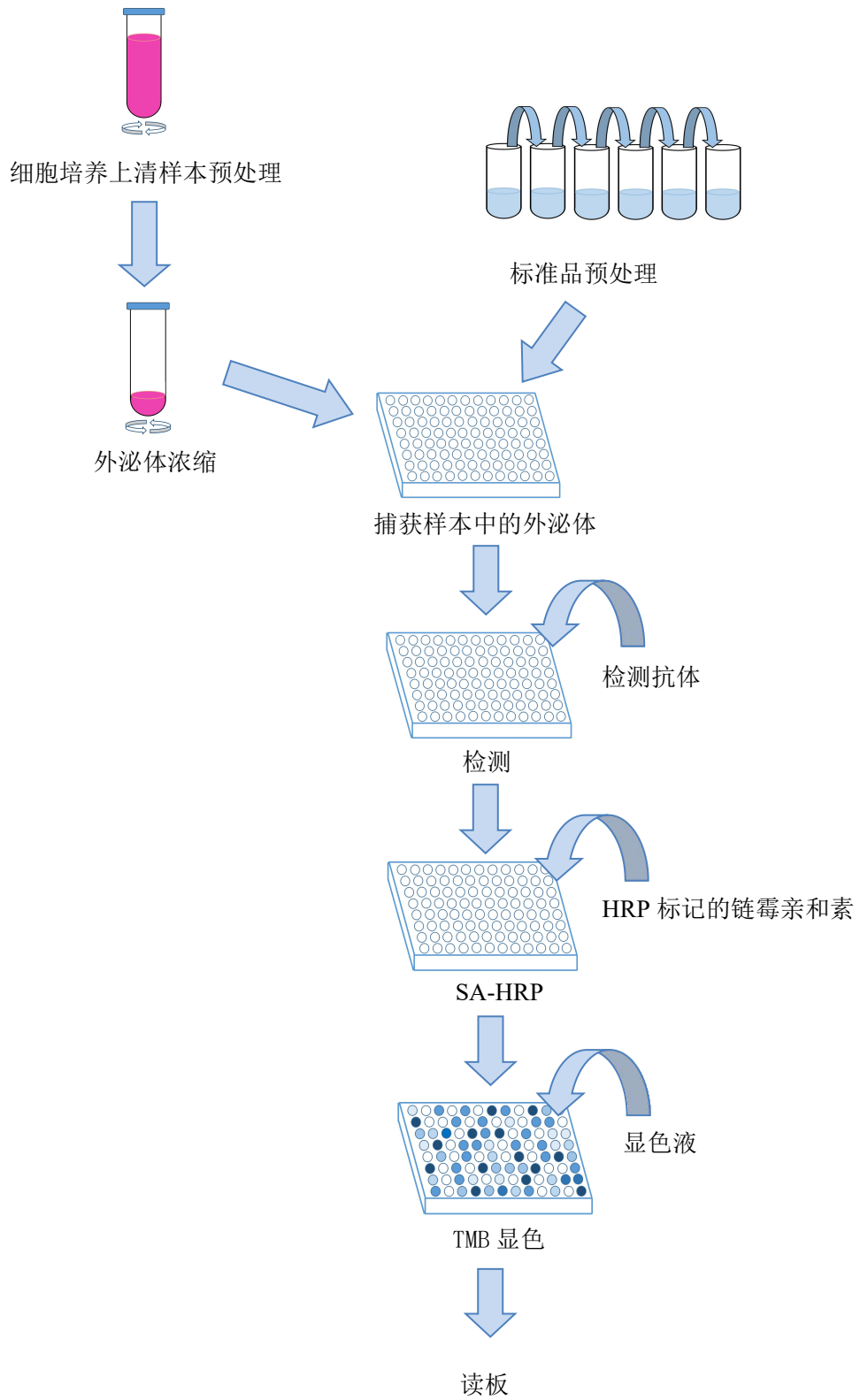


图 1 简单操作流程图

一、外泌体捕获

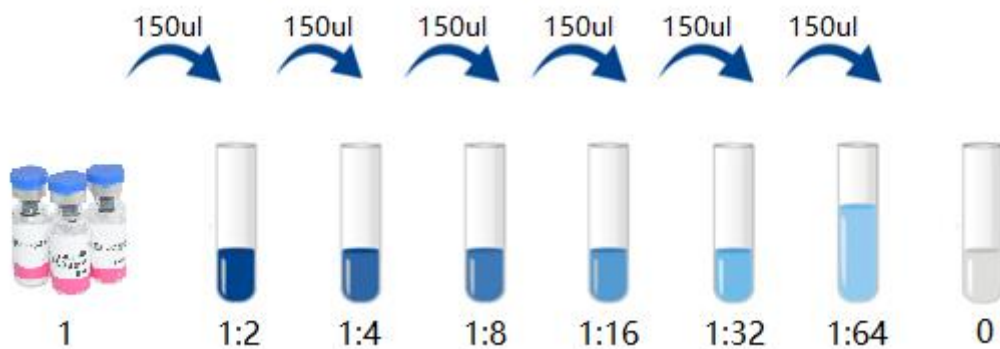
1. 样本和标准品预处理

3,000×g 离心 20 分钟，取上清。可选择截留分子量为 100KD 超滤管浓缩 20 倍，或采用润基生物的“外泌体浓缩试剂盒（细胞培养上清）(EXOCon40-10)”浓缩 20 倍，最高可浓缩 50 倍。

标准品用 1mL 去离子水溶解，移液器反复吹打 10-15 次，震荡混匀，外泌体浓度为 3.9×10^{10} 颗粒数/mL，最后将标准品用样本稀释液做倍比稀释。

注意：标准品一旦复溶，可分装保存，-20°C 存放三个月，-80°C 存放六个月

第 1 管至第 6 管，均先加入 150μL 的样本稀释液，第 1 管中加入标准品稀释原液 150μL，混匀，即标准品被稀释 1 倍，从第 1 管吸取 150μL 样品加入到第 2 管中，混匀，标准品被稀释 2 倍，依此类推，具体如下图。



注意：稀释时从高浓度到低浓度，加样时从低浓度到高浓度加样，可不换枪头。

2. 外泌体捕获

标准品和检测样本处理后，分别加入酶标板孔，每孔加入 100μL，用封板膜封板，37°C 孵育 2h。

二、外泌体定量

3. 检测外泌体

洗涤：小心揭掉封板膜，弃掉液体，在吸水纸上拍干，每孔加入 300μL 1×洗涤液，静置 1min，弃掉液体，在吸水纸上拍干，重复 3 次。

加液：检测抗体用样本稀释液稀释 500 倍，每孔加入 100μL，封板。

温育：37℃ 孵育 1.5 个小时；

洗涤：小心揭掉封板膜，弃掉液体，在吸水纸上拍干，每孔加入 300μL 1× 洗涤液，静置 1min，弃掉液体，在吸水纸上拍干，重复 3 次。

加液：HRP 标记的链霉亲和素用样本稀释液稀释 1000 倍，每孔加入 100μL，封板。

温育：37℃ 避光孵育 30min。

4.底物显色

洗涤：弃掉液体后在吸水纸上拍干，每孔加入 300μL 1× 洗涤液，静置 1min，彻底弃掉液体后在吸水纸上拍干，重复 5 次。

显色：每孔先加入显色剂 A 50μL，再加入显色剂 B 50μL，轻轻震荡混匀，不封板，37℃ 避光显色 3-5min，在白色背景下，肉眼观察孔内蓝色的出现，在一定范围内，孔内蓝色的深浅，与捕获的外泌体浓度呈正相关，即外泌体浓度越高，颜色越深。

5.读板

终止：每孔加终止液 50μL，终止反应，颜色由蓝色变为黄色，在酶标仪上读取 450nm 处各孔的吸光度值（OD 值）。

注意：加终止液时，要避免气泡产生而引起的假阳性。

三、数据结果分析

ELISA 的测定结果可分为两种：定性测定和定量测定。前者只需确定阴性或阳性既可；后者则需要得出具体的数值。在定量测定中，用梯度稀释的标准品做标准曲线，将对应的 OD₄₅₀ 值减去阴性对照的 OD₄₅₀ 值作为横坐标，将外泌体浓度作为纵坐标，生成标准曲线，得到标准曲线方程 $y=ax+b$ ，将所测样本的 OD₄₅₀ 值带入标准曲线方程后，计算得到检测样品中外泌体浓度，即 y 的值。

注意：样品的 OD₄₅₀ 值需落在标准曲线范围内，如果样品的 OD₄₅₀ 值超出标准曲线范围，需将样品稀释后检测。

数据示例：每次检测，每块酶标板都必须同时制作标准曲线，下面的标准曲线仅作为示例参考。

表 1 标准品梯度稀释后测得数据结果

	X(OD _{450nm})	Y(颗粒数/ml)
A	1.336	1.95E+09
B	0.852	9.75E+09
C	0.472	4.88E+09
D	0.251	2.44E+09
E	0.149	1.22E+09
F	0.102	6.09E+08

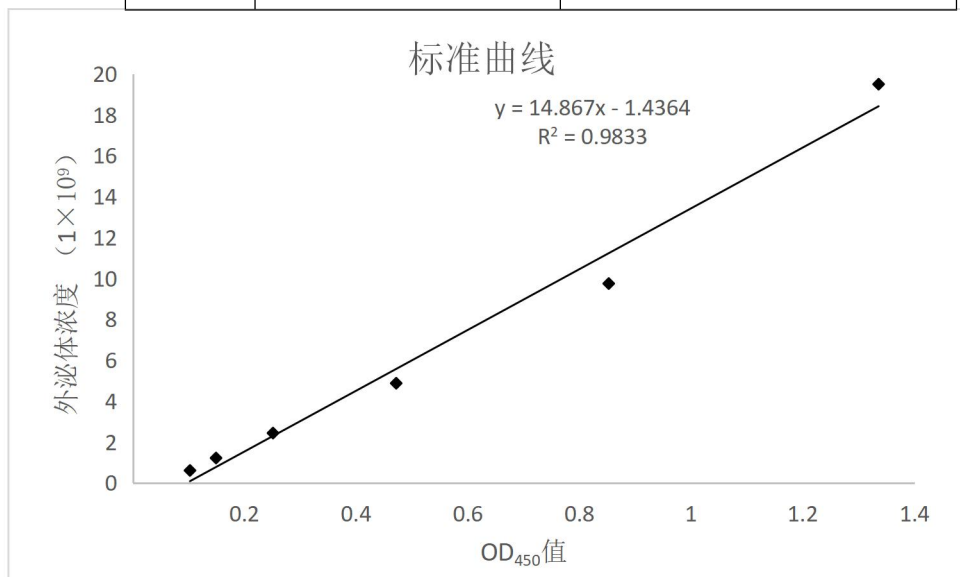


图 2 HEK293 细胞上清来源的外泌体标准曲线

四、试剂盒的性能

- 1、准确性：标准品线性回归与预期浓度相关系数 R 值 ≥ 0.95 。
- 2、灵敏度：本试剂盒可检测到的外泌体最低浓度 1×10^8 颗粒数/mL。
- 3、特异性：不与脂颗粒、蛋白污染物等交叉反应。
- 4、重复性：板内变异系数 $CV < 10\%$ ，板间变异系数 $CV < 13\%$ 。

相关产品信息

相关产品	目录号
外泌体提取试剂盒(血清/血浆)	EXORG50A-1/ EXORG30A-1
外泌体浓缩试剂盒 (细胞培养上清/尿液)	EXOCon10-10/ EXOCon40-10
外泌体 DNA 分离试剂盒	EXODNA50C-1/ EXODNA30C-1
外泌体 RNA 分离试剂盒	EXORNA50C-1/ EXORNA30C-1
DiO-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (green)	EXOPDiO10-1/ EXOPDiO20-1
DiI-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (red)	EXOPDiI10-1/ EXOPDiI20-1
DiR-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (red)	EXOPDiR10-1/ EXOPDiR20-1
PKH67-Membrane Exosome Labeling & Purification Kit (green)	EXOPPKH67-10/ EXOPPKH67-20
外泌体 Markers 检测试剂盒 (Western Blot)	xEXOWBxx-5
外泌体捕获和定量试剂盒 (ELISA)	RGEXOx96-1
外泌体捕获和分离试剂盒 (磁珠抗体捕获)	EXOMCUxx-10/ EXOMSPxx-10/

常见问题

Q1: 显色浅, 灵敏度低?

A1: 试剂盒 (包括未用完的板条及其他组分) 保藏条件不正确; 试剂盒使用时已超出有效期; 孵育时间和孵育条件不够等原因都会影响检测结果, 试剂盒内所有组分都应该 4°C 保存, 未用完的板条要密封保存。严格按照说明书操作, 过期的试剂盒不可以使用, 试剂开启后尽可能在短时间内用完。

Q2: 高背景甚至花板?

A2: 1. 室温过高, 可能会导致实验结果偏高, 如果发现所有的实验孔的读数均偏高, 尽可能将其稳定在 15-20°C 左右。

2. 酶标板孔内因清洗不彻底, 而导致有酶或底物残留, 同样会产生高背景。按说明书对 ELISA 酶标板进行清洗, 不任意减少洗板液的体积以及洗板次数, 可适当延长清洗液浸泡孔的时间。

3. 加样或加酶时导致了阴性孔的污染。此时需要及时更换吸头以避免造成污染。

4. 试剂过期或被污染。实验操作过程中不要使用过期试剂, 并防止组分污染。

如使用容器时, 应注意容器的清洁。

Q3: 检测重复性不好?

A3: 1. 加样量多少不一, 操作时间长短不一。重复同一样本时, 加样量与加样时间理应相同, 同时也应注意移液器的校准。加样后可轻微晃动酶标板使反应液充分混合。

2. 样本应保证一致、无污染, 并应该由同一名操作人员进行操作。

Q4: 白板?

A4: 试剂酶复合物或显色液没加、错加或失效污染, 都会导致白板, 要严格按说明书操作, 注意试剂的保存, 防止污染, 按顺序加液。

技术支持

关于查看详细产品信息和下载相关资料请登陆：<http://www.rengenbio.com>

同时可通过电话或 Email 接触技术支持。

辽宁润基生物科技有限公司

地址：辽宁省沈阳市经济技术开发区十三号路 77 号联东 U 谷 20 号楼

邮编：110027

电话：024-31086590

传真：024-31086589

邮箱：公司信息 info@rengenbio.com

技术支持 support@rengenbio.com

产品订购 order@rengenbio.com



微信公众号



外泌体研究交流群