从垃圾桶到金矿

外泌体的真实故事

AmyJet Scientific
艾美捷科技

SBI System Biosciences
Harnessing innovation to drive discoveries

咨询热线：400-6800-868

1 外泌体简介

1.1 什么是外泌体?
1.2 外泌体的生物起源
1.3 外泌体摄取
1.4 外泌体的大小和特征
1.5 EV（细胞外囊泡）作为癌症的生物标志物
1.6 为什么选择EV是生物标志物?
1.7 EV 的潜力不止于诊断

2 EV 作为疾病状态的生物标志物

2.1 脊髓性肌萎缩症的外泌体蛋白质生物标志物, Sci. Rep. 2017
2.2 多发性硬化症疾病状态的miRNA生物标志物特征, Sci. Rep. 2017

3 利用EV 作为生物标志物

3.1 最佳实践
3.2 EV生物标志物发现的挑战
3.3 ExoQuick ULTRA EV 分离试剂盒
3.4 需要高通量? 我们能满足!
3.5 ExoQuick 常见问题解答

www.amyiet.com

引言

打开任何一本20世纪90年代初的大学生物学教材，翻到书的索引部分，查找“外泌体”（exosomes），然后翻到对应的那一页。

你一定会在那一页的某个地方看到这样的解释：外泌体本质上是细胞的“垃圾箱”。

多年来，外泌体一直被视为无人愿意触碰的无用之物，但现在它们已经站在了极具突破性的诊断和治疗研究的最前沿。

它们已经成为新的“热门领域”。
这是它们令人惊叹的故事。关于它们是什么，它们能为我们做什么，以及如何利用它们的力量来开展研究、诊断和治疗，希望这些能够改变科学的世界。

第一章
外泌体介绍

什么是外泌体?

外泌体是一种源自内质网的细胞外囊泡，大小在30到100纳米之间。

一个关键因素将外泌体的形成与微囊泡（microvesicles）的形成方式区分开来。主要区别在于，外泌体的形成依赖于内质网系统，而微囊泡（大小为100-1000纳米）则源自细胞膜（见图1.1）。

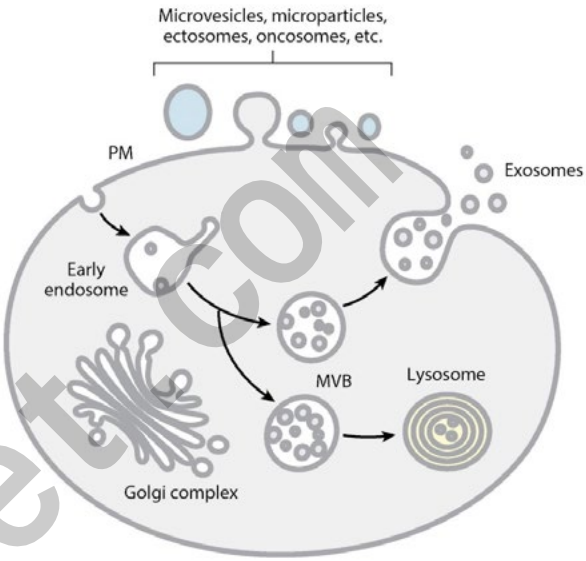


示意图1.1：外泌体形成。

外泌体的生物合成

从本质上讲，外泌体的生物合成途径相对直接。

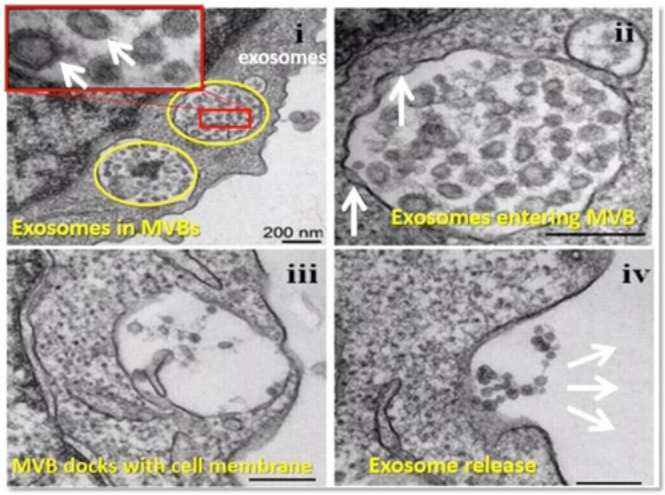
外泌体的生物合成始于细胞膜的内陷。细胞膜的向内出芽导致早期内体的形成。

在这个途径中，早期内体最终成熟为晚期内体/多泡体（MVBs）。

在多泡体（MVBs）内，外泌体以腔内囊泡（ILVs）的形式起源（见示意图1.1）。

当多泡体被运输至细胞膜并与之融合时，外泌体的生物合成过程结束；此时，腔内囊泡（ILVs）被释放到细胞外环境中。

一旦被释放，这些腔内囊泡便被称为外泌体。



Sahoo S. et al. Circ Res. 2011

图1.1：外泌体的生物合成

www.amyjet.com

外泌体摄取

虽然外泌体生物发生途径的关键是相对线性的，但外泌体摄取是一个完全不同的故事。这是因为，在它们释放到细胞外环境后，外泌体摄取的途径是多方面的。

首先，外泌体摄取既可以是局部过程，也可以是远处过程。换句话说，当邻近细胞能够与新释放的外泌体相互作用或利用时，外泌体也可能通过血流被运送到更远的地方。

在任何一种情况下，外泌体摄取的机制都更加多样化。它们包括从囊泡-细胞融合到内吞作用到重要的配体-受体相互作用的一切（示意图1.2）。

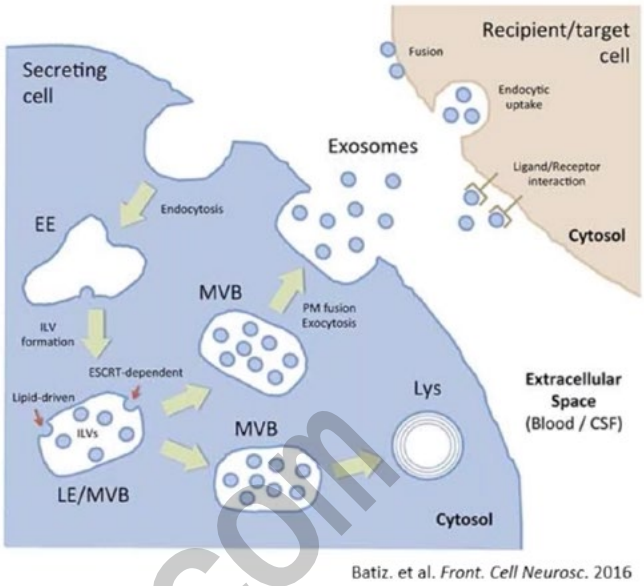


示意图1.2：外泌体摄取与释放

外泌体的大小和特征

如前所述，外泌体的大小在30-100纳米之间，这些囊泡可以由多种细胞分泌；它们的组成在很大程度上取决于它们的来源细胞。

值得注意的是，几乎所有被研究过的哺乳动物细胞都表现出基于外泌体的通讯。

和这些细胞一样，外泌体的内容物也会有很大的变化。这是因为外泌体内容物可以包括蛋白质，如酶，以及mrna和ncRNAs，脂质等等（示意图1.3）。

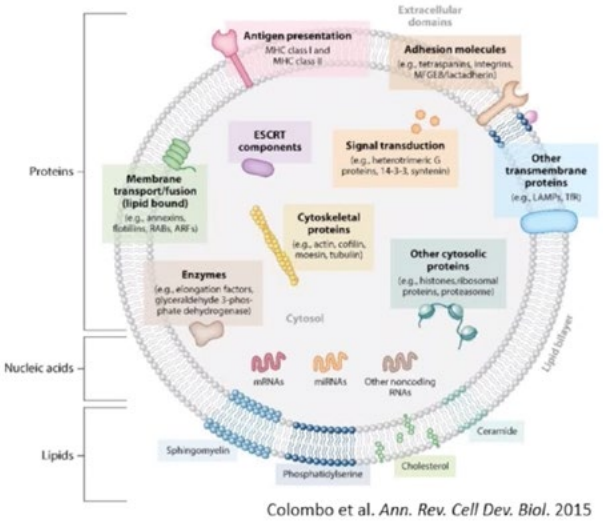


示意图1.3：外泌体特征。

www.emyiet.com

EV 作为癌症的生物标志物

细胞起源和外泌体内容物之间的这种联系对于外泌体研究这一新兴领域至关重要；包括外泌体和癌症之间的相互作用。

科学家们开始了解外泌体内容物可以作为有用的癌症生物标志物，甚至可以作为许多其他疾病的生物标志物，如神经退行性疾病。

正如你所预料的那样，这些发现和其他发现导致近年来基于外泌体的癌症生物标志物研究迅速增加，并为各种肿瘤疾病的检测、监测和治疗带来了很多希望（示意图1.4）。

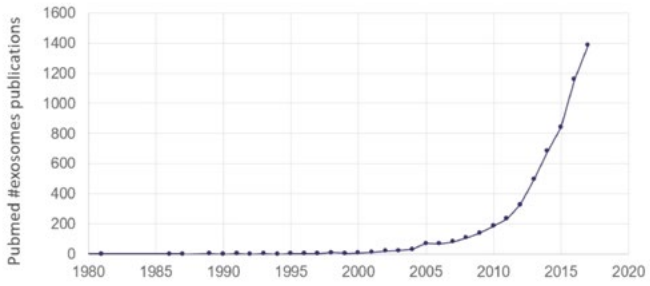


示意图1.4：外泌体研究的增长。

为什么EV 是生物标志物?

那么，为什么包括外泌体在内的细胞外囊泡是如此有用的生物标志物呢？

主要原因很简单。这是因为它们几乎存在于你能想到的所有生物体液中（示意图1.5）。细胞外囊泡可在以下液体中发现：

- 血清、血浆
- 尿
- 精液
- 脑脊液
- 唾液
- 眼泪
- 母乳

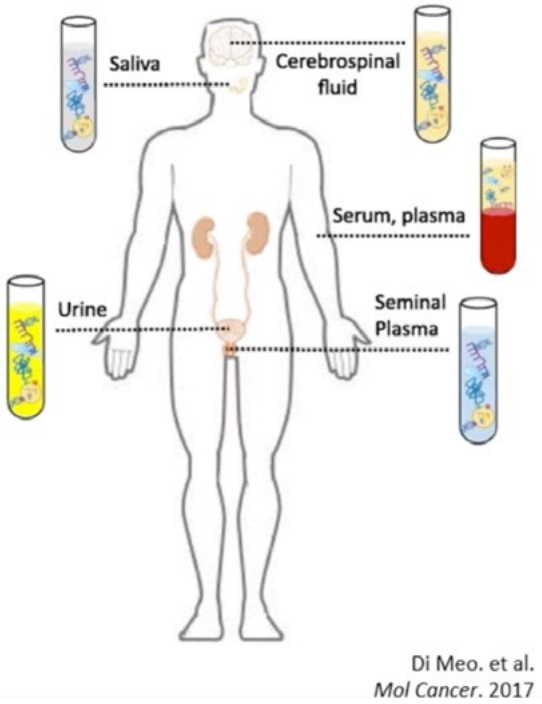


示意图1.5：发现EV 的人体体液。

这种普遍性使得基于细胞外囊泡的诊断更加实用

www.amyiet.com

这种普遍性使得基于细胞外囊泡的诊断在易用性、速度和微创性方面更加实用。

此外，细胞外囊泡可以用作生物标志物，而不仅仅是用于初始诊断目的。这些囊泡，包括外泌体，可以作为总体预后指标以及对顺铂等治疗反应的预测因子。

因此，一刀切的治疗方法有望很快成为过去时代的一部分。

因此，希望“一刀切”的治疗方法很快会成为过去式。

EVs的潜力超越诊断

换句话说，我们正在走向可定制的、以病人为中心的治疗方法。

例如，我们可能能够识别出我们需要在特定患者身上改变的蛋白质或microRNA。然后，同一个病人的外泌体可以被分离出来，用适当的siRNA或蛋白质修饰，然后放回病人体内进行治疗(示意图1.6)。

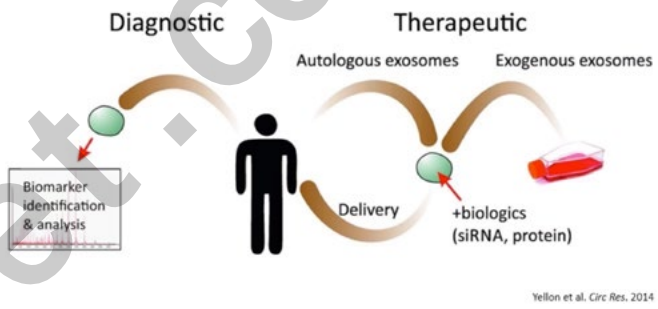


示意图1.6：外泌体的诊断和治疗用途

www.amyiet.com

第二章
EV 作为疾病状态的生物标志物

脊髓性肌萎缩的

外泌体蛋白生物标志物

综上所述，很明显，细胞外囊泡在健康和疾病中发挥着重要作用。

让我们通过回顾一些最近有趣的外泌体研究来更具体地了解这是如何发生的。

我们将从发表在《科学报告》上的一项研究开始，该研究展示了基于外泌体的蛋白质生物标志物的重要性。

在这项研究中，研究人员研究了脊髓性肌萎缩症（SMA）、存活运动神经元（SMN）基因、外泌体和存活运动神经元（SMN）蛋白之间的联系。

SMA是一种遗传性疾病。它是由SMN1基因的纯合突变或缺失引起的；疾病的严重程度随后由高度相似的SMN2基因的拷贝数来调节（示意图2.1）。

SMA的最终结果是全长SMN蛋白明显缺乏；SMA的严重程度与SMN蛋白的产生量呈负相关。

你可能知道，SMA是一种高度衰弱的神经肌肉疾病。尽管反义寡核苷酸疗法（Spinraza）最近被批准用于治疗这种疾病，但客观、微创的方法仍有很大的发展空间，通过这种方法可以更准确地确定疾病的严重程度、预后，甚至治疗方向。

SMA的最终结果是全长SMN蛋白明显缺乏。

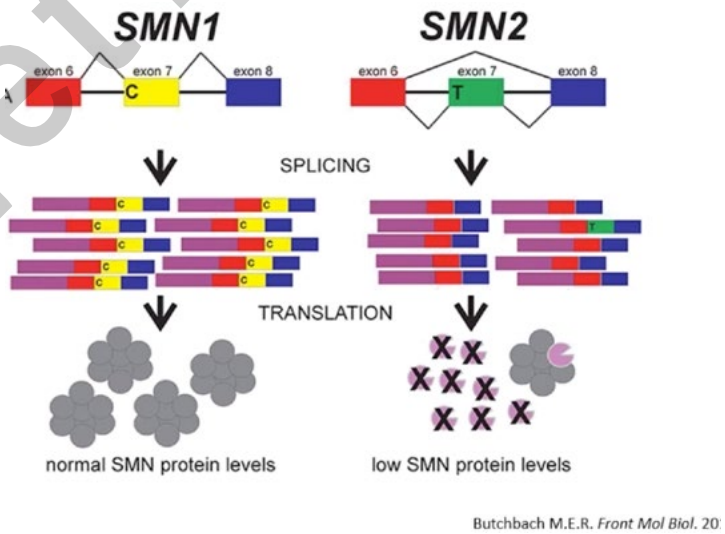


示意图2.1:SMA存活运动神经元蛋白。

至少就遗传疾病而言，新生儿最常见的死亡原因是脊髓性肌萎缩症（SMA）。SMA的特点是全长存活运动神经元（SMN）蛋白缺乏，α-运动神经元变性，骨骼肌萎缩。SMA是由SMN1基因的纯合缺失或突变引起的。虽然人类确实具有高度相似的SMN1基因拷贝（SMN2），但其中的同义点突变导致产生缺乏外显子7的mRNA。因此，SMNΔ7蛋白是不稳定的，不能像全长SMN蛋白那样发挥作用。

www.anyiet.com

这就是通过本研究测量外泌体衍生的SMN蛋白生物标志物的地方。

对来自许多细胞系的TCA沉淀物中发现的蛋白质的检查显示，SMN蛋白通常从细胞中释放出来，并在细胞培养基中进入细胞外环境（示意图2.2）。

鉴于此，确定SMN蛋白是否可以在细胞外囊泡，特别是外泌体中检测到是很重要的。因此，作者使用免疫金标记进行了电子显微镜检查。由此，他们确定外泌体明显含有SMN蛋白，而任何类型的囊泡外都很少含有SMN蛋白。

简而言之，这意味着细胞通过外泌体自然释放SMN蛋白（示意图2.3）。

然后，利用小鼠SMA模型，科学家们确定外泌体内SMN蛋白的数量清楚地反映了细胞内含量和疾病状态。健康小鼠的外泌体中含有高水平的SMN蛋白，而患病小鼠的外泌体中SMN蛋白含量较低或检测不到。

在健康对照组、携带者和SMA患者中也发现了类似的结果。这意味着，携带者的外泌体SMN蛋白水平低于对照组，而SMA患者的外泌体SMN蛋白水平几乎无法检测到（示意图2.4）。

此外，作者还量化了外泌体本身的水平。重要的是，他们观察到与对照组相比，SMA患者血清中的外泌体数量增加。

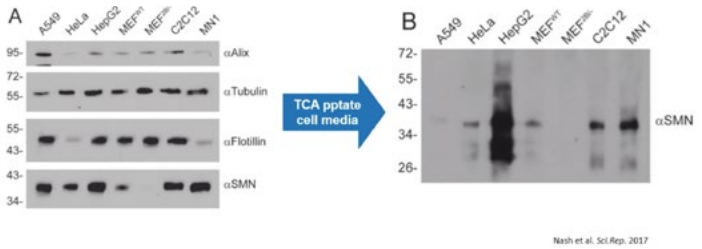


示意图2.2:SMN蛋白被释放到细胞外环境。

细胞将SMN蛋白释放到细胞外环境。据该研究的作者称："各种细胞系在35毫米的培养皿中培养24小时。去除培养基，用蛋白加载缓冲液裂解细胞，分析细胞内蛋白含量（图A），用TCA沉淀培养基分析细胞外蛋白含量（图B）。等量的蛋白质样品进行SDS-PAGE处理，转移到尼龙膜上，用Alix、微管蛋白、flotillin或SMN抗体进行免疫印迹检测。数据具有代表性，n = 3。

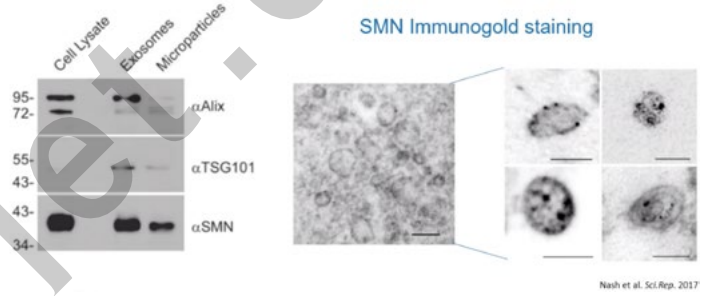


示意图2.3：释放到细胞外环境中的SMN蛋白在ev中受到限制。

作者首先从A549细胞中分离出微粒和ev，这些细胞生长在补充了囊泡耗尽的FBS的培养基中，使用差速离心，并使用纳米颗粒跟踪分析确定了它们的大小分布。细胞外囊泡（5 μg）的蛋白进行SDS-PAGE检测，由此产生的免疫印迹检测Alix、TSG101和SMN…SMN蛋白的免疫金标记用于证明在a549衍生的外泌体中存在SMN蛋白（比例尺代表100 nm）…更高放大的电镜图像显示外泌体中含有SMN蛋白（比例尺代表100 nm）。

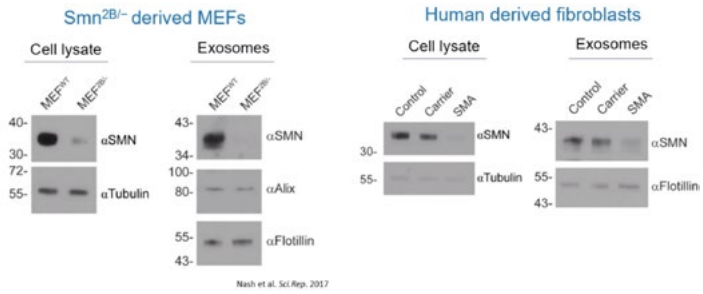


示意图2.4：外泌体内SMN蛋白的数量与宿主细胞蛋白表达水平相关。

www.allyiet.com

总体而言，SMA患者的血清外泌体水平升高，但这些囊泡内的SMN蛋白含量较低（图2.5）。

这些结果具有重要意义。他们认为，可能有一种实用的方法，我们可以通过量化基于外泌体的SMN蛋白来诊断和监测SMA，包括对治疗的反应生物标志物和血清源性外泌体本身的浓度。所有这些，都使用了微创技术。

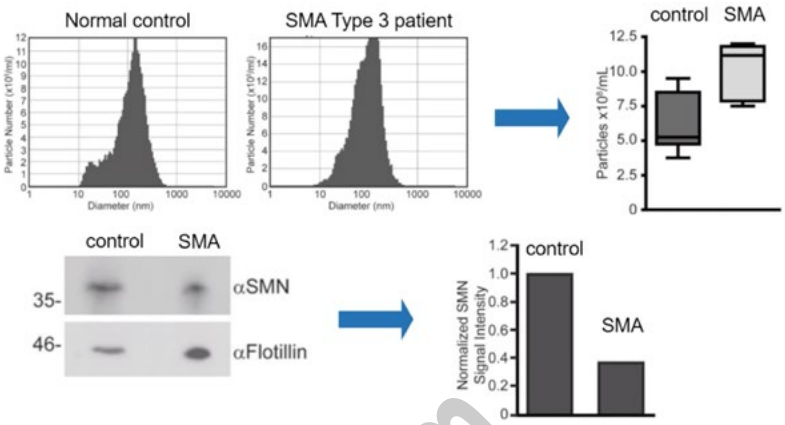


示意图2.5：人血清衍生EVs中SMN蛋白水平反映疾病状态。

多发性硬化症外泌体miRNA生物标志物

这并不是外泌体中包含的生物标志物用于评估疾病状态的唯一方法。

除了蛋白质，外泌体中的另一个主要成分是microRNA （miRNA）。最近的一篇论文评估了多发性硬化症的外泌体miRNA生物标志物和特征，以确定它们是否能准确反映患者的疾病状态。

你可能知道，多发性硬化症（MS）是一种慢性炎症，脱髓鞘，神经退行性疾病。

MS的临床表型多种多样，包括：

- 复发缓解型多发性硬化（RRMS）
- 原发性进行性多发性硬化（PPMS）
- 继发性进展性MS （SPMS）

虽然RRMS是最常见的MS形式，占所有病例的70%以上，但在发病10-15年内，大多数RRMS患者将进展为SPMS。不幸的是，SPMS是MS的一个阶段，以临床症状和体征逐渐恶化以及对现有治疗的异质性或完全缺乏反应而闻名。

到目前为止，还没有针对多发性硬化症的单一确定测试方法，因此，由于其诊断和疾病进展的监测依赖于多个（有时是主观的）临床参数，因此很难诊断这种疾病；比如身体检查、核磁共振成像和脑脊液评估。

www.amyiet.com

正在进行的研究表明，循环外泌体是有希望的MS候选生物标志物。因为它们可能含有从核酸到蛋白质的一切物质，并且可以穿过血脑屏障。生物标记物可用于识别能够从治疗中获益最多的患者。

换句话说，我们非常需要客观、简单、甚至是微创的液体活检和标志物（如miRNA生物标志物）来对多发性硬化症患者进行分层。

因此，一项研究的作者假设血清外泌体miRNAs可以代表一种有用的基于血液的检测和监测MS的方法。

研究人员首先从对照和多发性硬化症患者的血清中分离和表征细胞外囊泡（EVs）。

使用每个个体1ml的血清，作者用RNaseA处理血清样本，以去除任何未受保护的循环RNA，使用大小排除色谱法分离外泌体，并通过纳米颗粒跟踪分析和透射电子显微镜对其进行分析。

外泌体标记如CD81、CD63和Alix被证实存在（示意图2.6）。

RNA提取得到了我们期望的外泌体的RNA图谱；生物分析仪显示25- 200nt之间的典型峰值，没有任何核糖体RNA的迹象。作者还比较了经过和未经过RNAse预处理的样品之间的miRNA谱（示意图2.7）。

研究人员能够鉴定出一组外泌体miRNAs，这些miRNAs在MS亚型之间的表达存在差异。

此外，他们评估了每种候选miRNA的接收者操作特征（ROC）曲线和曲线下面积（AUC）指标，分别针对复发缓解型多发性硬化症（RRMS）和继发性/原发性进展型多发性硬化症（S/PPMS）与对照组进行比较。通过组合不同的miRNA组合，研究人员创建了miRNA特征谱，从而提高了区分多发性硬化症亚型与对照组的能力。

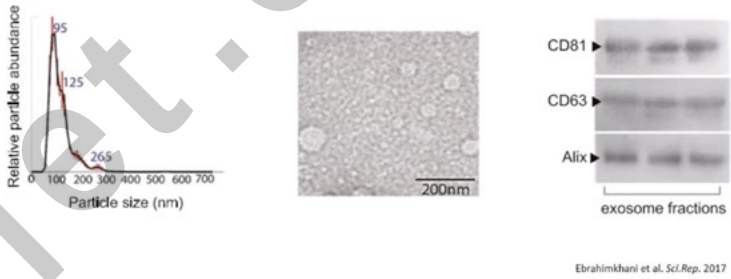


示意图2.6：血清源性EVs的鉴定与表征。

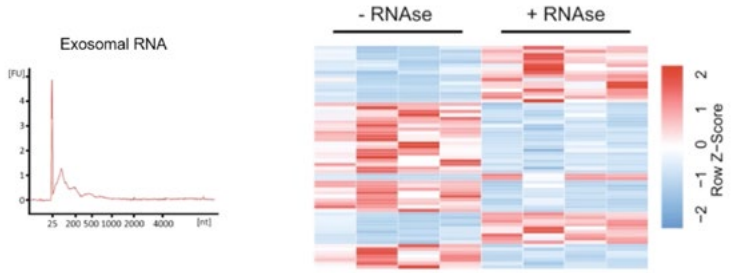


示意图2.7：血清外泌体携带独特的miRNA特征。

虽然过去已经提出了许多候选miRNA作为MS的潜在生物标志物，但本研究中确定的生物标志物总体上是全新的。这可能是因为与自由循环的miRNA相比，外泌体的独特成分谱之间存在各种差异。

最重要的是，这项研究表明血清外泌体是潜在有用的miRNA生物标志物的新来源。

www.amyjet.com

第三章
利用EV 作为生物标志物

最佳实践

也许所有这些有趣的研究都让你对细胞外囊泡分离及其潜力感到兴奋。

不过，有几件事你可能需要考虑。

第一个围绕着如何区分不同EV亚群方面的困惑和缺乏共识。

幸运的是，2014年，国际细胞外囊泡学会（ISEV）提出了细胞外囊泡定义的最低实验要求。

总而言之，该指南指出——如果您要表征单个囊泡——您应该使用两种不同但互补的技术。例如：电子显微镜或原子力显微镜来获得EV的图像以评估其大小和形状；以及单颗粒追踪（NTA），可以同时评估大小和数量。

ISEV对一般特性的要求包括：

- ≥ 3个EV阳性蛋白标志物，其中至少一个是：

  跨膜/脂结合蛋白

  细胞质蛋白

- ≥1个阴性蛋白标志物，如argonaute或组蛋白，这些不应该包含在外泌体中。

鉴于此，让我们假设您希望将细胞外囊泡分离工作专门集中在外泌体上。也许您正在寻找外泌体生物标志物，或者您正寻求实际使用已知的基于外泌体的生物标志物用于下游目的。

利用这些外泌体作为生物标志物时，你还应该记住哪些重要的事情？

首先，让我们考虑一个基本的外泌体研究工作流程（示意图3.1）。

示意图3.1外泌体研究工作流程。
From SBI

www.amyjet.com

EV生物标志物发现的挑战

正如您可以想象的，鉴于上述讨论，在使用EV 进行生物标志物发现方面存在许多挑战。

EV的两种主要成分是RNA和蛋白质；我们将从围绕前者的挑战开始，然后转向涉及后者的挑战。

外泌体RNA主要由20～200nt的种组成；包括microRNA、lncRNA、mRNA等（示意图3.2）。

这里的挑战之一是浓度将会非常低。与此同时，我们需要确定我们识别的是外泌体中发现的RNA，而不是其他可能性，比如游离循环RNA。

此外，重要的是要考虑到外泌体RNA的组成在个体和样本类型之间会有很大差异。

一个典型的例子是：在一篇论文中，评估了血清和尿液样本中的外泌体RNA。两种样本类型之间存在明显区别。例如，血清样本中的microRNA远比尿液样本丰富。然而，个体内部也存在很大的变异性（示意图3.3）。

在SBI，我们使用Exo-NGS服务生成了一些有趣的数据。我们发现，就像以前一样，外泌体RNA的组成在不同类型的样品之间差异很大（示意图3.4）。

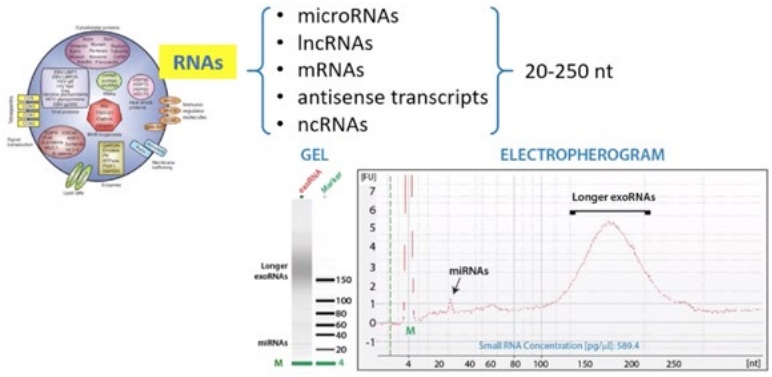


示意图3.2：外泌体RNA挑战：浓度和组成。

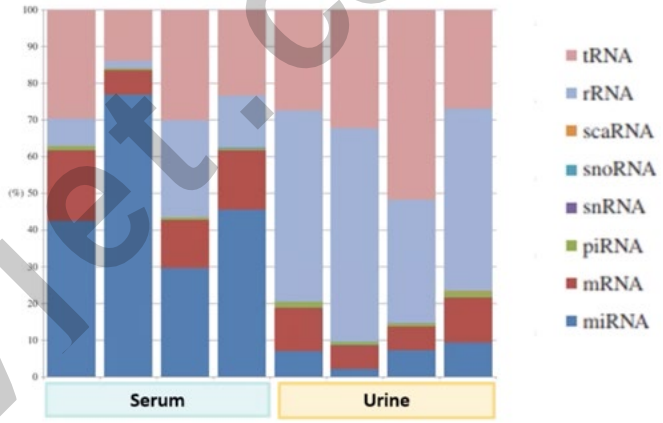


示意图3.3：外泌体RNA的分类组成。

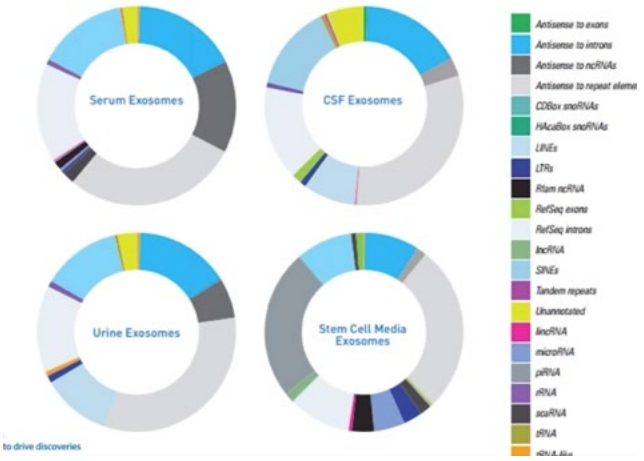


示意图3.4：体液中外泌体RNA的类别组成。
From SBI

www.anyiet.com

因此，用于评估或提出新的生物标志物的样本数量非常重要。

同样，人们对待样品的方式、处理和分离；所有这些因素都将影响外泌体RNA的最终组成和组成，从而影响生物标志物发现的整个过程。

至于蛋白质，外泌体中也有很多蛋白质。它们包括细胞骨架蛋白、酶和信号转导蛋白等（示意图3.5）。

目前用于表征EVs中蛋白质的方法包括western blotting、蛋白质阵列和质谱分析。

Western blotting易于操作，并且有大量可用的抗体。因此，如果您知道目标蛋白是什么，蛋白质印迹是很好的选择。然而，如果您参与生物标志物发现，那么您应该记住，使用蛋白质印迹相当有限；它的通量低，并且您只能评估已知标志物的身份。

然而，蛋白质芯片具有可扩展的优势；具有中低通量，并且有许多商业化的检测组合可用。话虽如此，蛋白质芯片昂贵，存在定量偏差，而且同样地，您只能识别已知标志物。

最后是质谱分析；这是最全面的方法。它是一种无偏倚的蛋白质定量方法。当然，它相当复杂，需要专业知识，并且成本高昂。更不用说：它对样品中的污染蛋白极其敏感。

将所有这一切置于血清和血浆中典型蛋白质谱的背景下；其中包含超过50%的白蛋白。相比之下，低丰度蛋白质库约占总蛋白质的5%-10%（示意图3.6）。因此，在这些含有大量背景和污染蛋白的样本中，很难找到这些生物标志物。

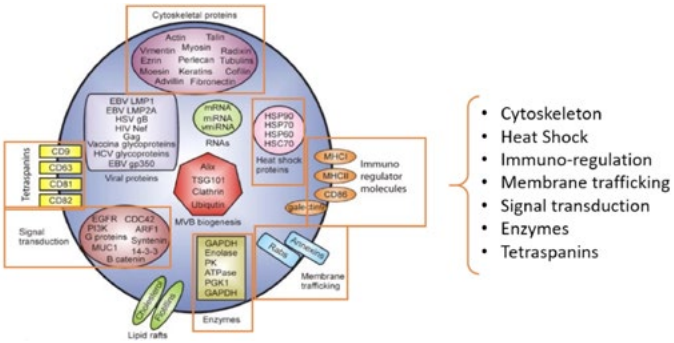
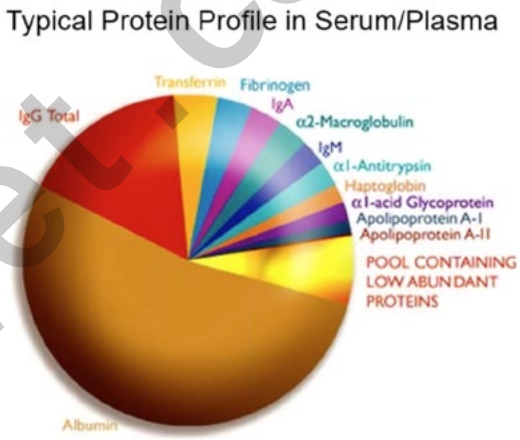


示意图3.5: 外泌体蛋白



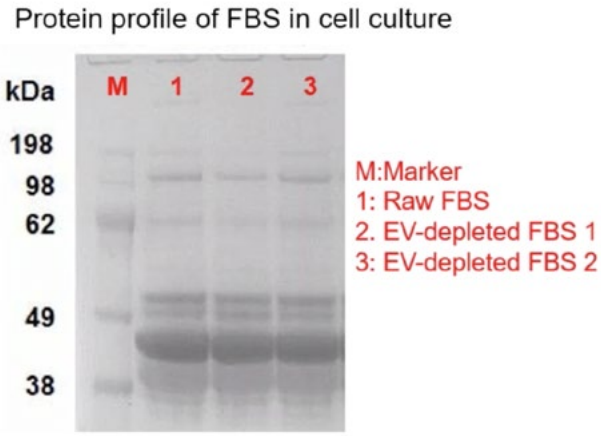


示意图3.6：样品中有什么？EV蛋白生物标志物发现的挑战。

www.anyiet.com

为了更实际地了解这对您的研究的影响，我们生成了一些
我们比较了我们提供的标准制剂和ExoMS表面蛋白捕获试剂盒的质谱（示意图3.7）。在没有分离后清理的情况下，映射到载脂蛋白、纤连蛋白、IgG或血清白蛋白的读段百分比极高。超过所有读段的45%。

因此，如果你正在进行昂贵的质谱分析，而几乎一半的读数是背景蛋白质，你可能会错过非常重要的生物标志物！

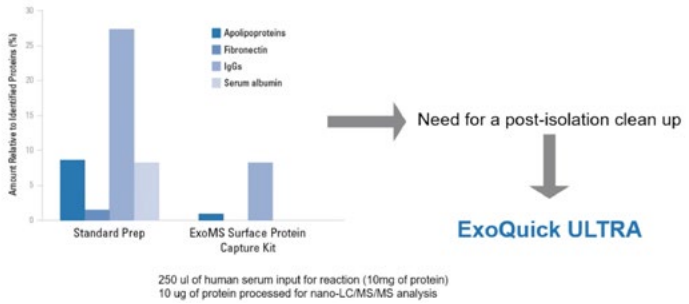


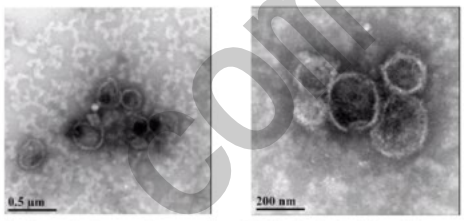
示意图3.7：质谱检测的蛋白质背景。
From SBI

ExoQuick ULTRA EV 分离试剂盒

因此，分离后清理工作的必要性非常明显。这就是我们推出ExoQuick ULTRA的原因。

用ExoQuick ULTRA分离的EV显示出您期望的EVs形态（图3.1）。

使用ExoQuick ULTRA，您还能够显著减少背景和污染蛋白（如白蛋白和IgG）的量。因此，与其他市售试剂盒和超离心相比，外泌体标记物（如CD9、CD81和Hsp70）的检测显著增加（示意图3.8）。



Transmission electron micrographs of EVs isolated from human serum using ExoQuick ULTRA. The same sample is shown at two different magnifications. Multiple vesicles with typical EV morphology can be seen in each image

图3.1:ExoQuick ULTRA分离的EV显示典型的EV形态。
Taken from powerpoint slide show. Please provide a citation.

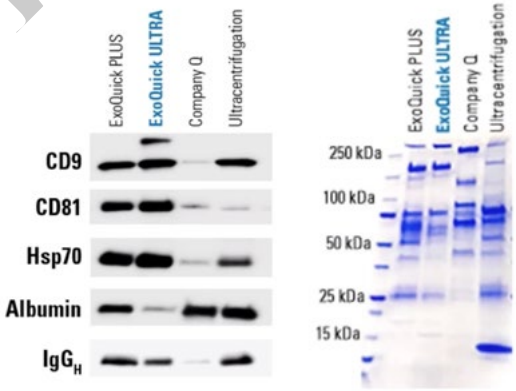


示意图3.8：使用ExoQuick ULTRA提高纯度。
考马斯蓝染色蛋白凝胶比较使用不同方法分离的外泌体制备物的蛋白质含量，与其他方法相比，在ExoQuick ULTRA通道中只有少数明确的蛋白质带。凝胶的Western blotting显示，ExoQuick ULTRA制剂含有最高水平的外泌体特异性标记物CD9、CD81和Hsp70，而携带蛋白白蛋白和IgGH的水平最低。相比之下，来自Q公司的制剂似乎主要是白蛋白，甚至使用超离心制备的样品也含有相当高水平的白蛋白和IgGH。每条通道加载7 µg总蛋白，采用荧光量子比特蛋白测定法测定。
From SBI

www.anyiet.com

这是因为，当我们去除白蛋白和IgG时，我们最终上样的是比其他EV制备物相对更高量的EV。

ExoQuick ULTRA还允许您提高产量。这使您能够与其他市售试剂盒或超速离心相比，在标准化的输入体积和每毫克蛋白质下分离出更多的EV（示意图3.9）。

如何利用ExoQuick ULTRA的力量？

实际上，你可以遵循一个非常简单的方案（示意图3.10）。

- 将ExoQuick ULTRA加入250µL血清或血浆中，在4C下孵育30分钟
- 以3000g的速度离心10分钟收集EV
- 重悬EV并添加到预洗的ExoQuick ULTRA柱
- 旋转1000gx 30秒并收集EV-他们现在即可使用

ExoQuick ULTRA的主要优点是：

1. ExoQuick ULTRA产生更纯净的制备物
2. 与超离心或其他试剂盒相比，当开始使用相同数量的材料时，ExoQuick ULTRA增加了EV分离的产量。

这使得生物标志物检测快速、经济高效且得到改进。

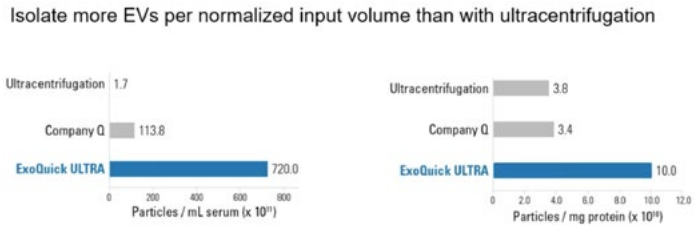


示意图3.9：与其他方法相比，ExoQuick ULTRA提高了纯度。
荧光纳米颗粒跟踪分析（fNTA）表明，与超离心相比，ExoQuick ULTRA提供了高EV产率。通过输入血清量（每mL，A）和输入血清蛋白量（每mg，通过荧光量子比特蛋白测定，B）比较不同分离方法对EV产率的影响。使用fNTA测量颗粒数，这是一种专门检测EV的技术。
From SBI.

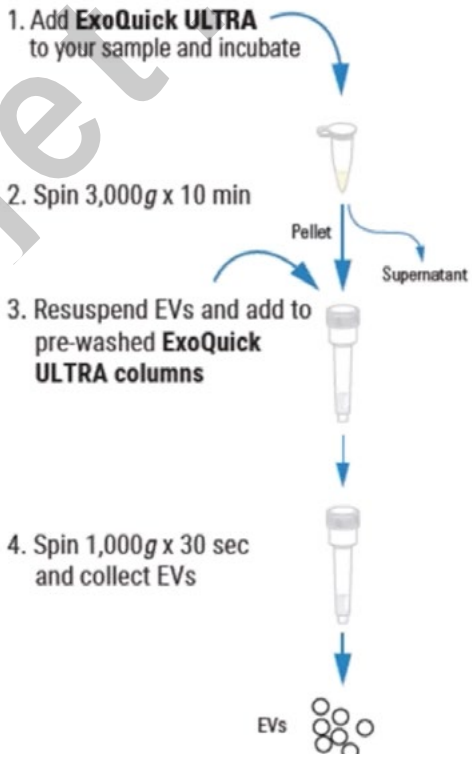


示意图3.10: ExoQuick ULTRA -他是如何工作的？
From SBI.

www.amyjet.com

需要高通量？
满足您需求。

我们相信，ExoQuick ULTRA是目前市场上处理单个样本的最佳方式。

但如果您需要一个快速、简便且高通量的EV分离系统呢？如果您需要快速同时收集和比较来自多个来源的EV呢？

我们也为此开发了行业领先的解决方案。

它被称为SmartSEC HT EV隔离系统 (SmartSEC HT EV Isolation System)；一种专有的基于色谱的EV分离方法，具有令人印象深刻的96孔板，格式，允许您在不到1小时内从尽可能多的样品中分离EV。

最重要的是，SmartSEC HT是一种高性能系统，其纯度和产量优于超离心和市场上的同类系统。

我们也有数据支持我们的说法（示意图3.11和示意图3.12）。

正如您可能想象的那样，SmartSEC HT是一个非常强大的系统，可以加速和改善您的EV生物标志物发现以及诊断和治疗研发。

而且它可以轻松使用。实际上只需三个简单的步骤（示意图3.13）。

步骤1. 您所需要做的就是准备滤板，并在每个孔中加入250 - 500µL的清血清或血浆。孵化

步骤2. 用离心机洗脱第一部分。

步骤3. 加入等量的SmartSEC隔离缓冲液，再次离心至干净板中洗脱第二部分。

就是这么简单。

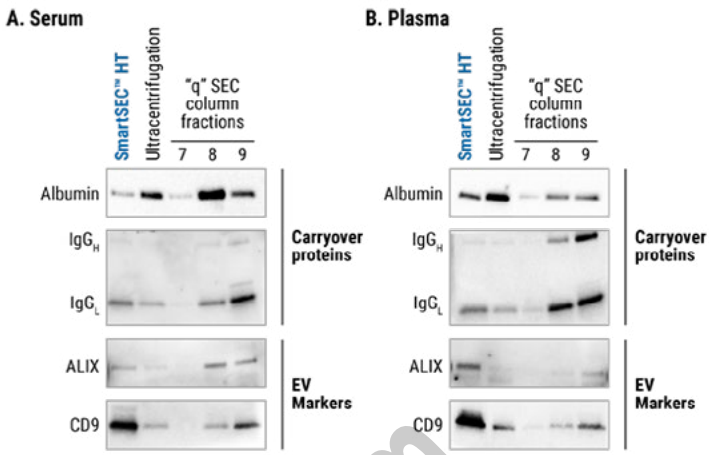


示意图3.11:SmartSEC™HT提供高EV产量和低水平的不良残留蛋白
从500µL血清(A)或血浆(B)中按指定方法制备EVs。用于Western blot分析，从第一部分中提取1µg蛋白当量，装入每个通道。SmartSEC HT 比超离心和竞争对手q的SEC色谱柱性能更好。

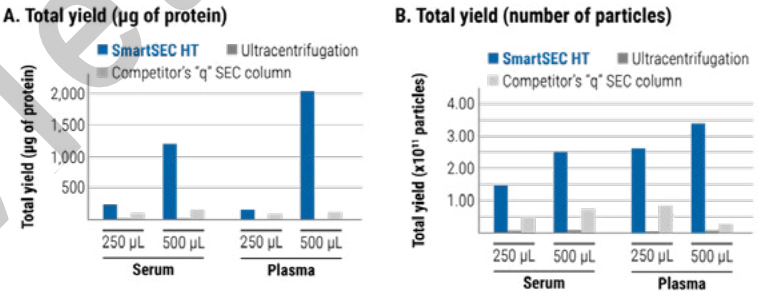


示意图3.12：与超离心和竞争对手"q"的SEC色谱柱相比，SmartSEC™HT的产率更高。

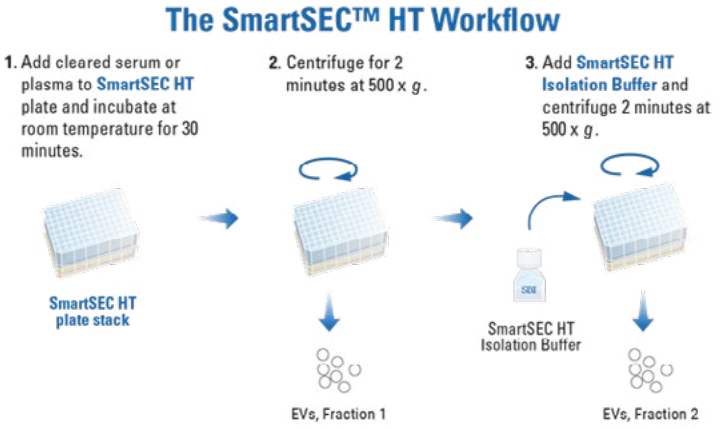


示意图3.13

www.anyiet.com

ExoQuick Q&A

Q. EVs 是否会将核衣壳分泌到血液中?

A. 根据目前可用的文献，我们知道虽然核衣壳可以在EV内部找到，但EV并不分泌它们。

Q. 用ExoQuick ULTRA可以恢复多大的囊泡?

A. 根据制备方法不同，在70-200 nm之间。

Q. 将EVs与培养基分离开来的最好方法是什么?

A. 这个答案取决于您将对外泌体使用的下游应用；这将改变您的方法。重要的是，我们有一个专门为组织培养基和含量较少的液体（如CSF或尿液）设计的ExoQuick ULTRA版本。这个版本叫做ExoQuick ULTRA TC。

Q. ExoQuick可以用于功能性EV分离吗?

A. 是的，当然可以。这正是ExoQuick ULTRA的明确目的。

Q. 当试图从EV中获得足够的小RNA用于库准备和NGS时，最好的系统是什么?

A. ExoQuick ULTRA将是一个非常好的选择，因为您去除了背景蛋白，所以您能得到更纯净的制备物，同时提高了产量。

Q. 人血清需要多少毫升?

A. 您可以从100-250微升开始。

Q. ExoQuick是否具有高通量格式，比如96孔血清格式?

A. 我们目前还没有。我们理解这对于临床应用会使事情容易得多，但实际上，使用基于沉淀的方法处理许多样本甚至比依赖超速离心或其他方法更好。

www.anyiet.com

Q. 不同样本中EV大小的范围或异质性是什么？

A. EV的大小范围是相当异质的，因为它包括大小在70-250 nm之间变化的外泌体和微囊泡。对于外泌体和微囊泡之间的大小差异，没有具体的分界点。

Q. 你们在分离前用蛋白酶处理外泌体，以消除污染的蛋白质吗？

A. 不。一般来说，蛋白酶不会消除污染蛋白，而且在您的分离程序中添加更多蛋白质也没有充分的理由。

Q. 如何在**PBS**中溶解外泌体颗粒？因为它们很难溶解？

A. 虽然可能需要1-2分钟的移液操作，但即使是难以溶解的沉淀也能溶解。

Q. 你建议用**TM**确认**EV**标记物吗？

A. 对于一般的外泌体或EV标志物，蛋白质印迹（Western blotting）就很好。在非常特定的应用中，您可能希望对您已识别的任何特定生物标志物使用透射电镜进行免疫金标记。

Q. 外泌体稳定吗？

A. 就pH或蛋白酶稳定性而言，它们非常稳定。

Q. ExoQuick ULTRA 可以用于隔离特定尺寸的EVs吗？

A. ExoQuick无法区分不同类型的EV。它分离的是异质性的EV群体。

Q. 我从哪里可以得到这本电子书中的图片？

A. 如果您想要这些图片的副本，请发送电子邮件至 **tech@systembio.com**

www.amyiet.com