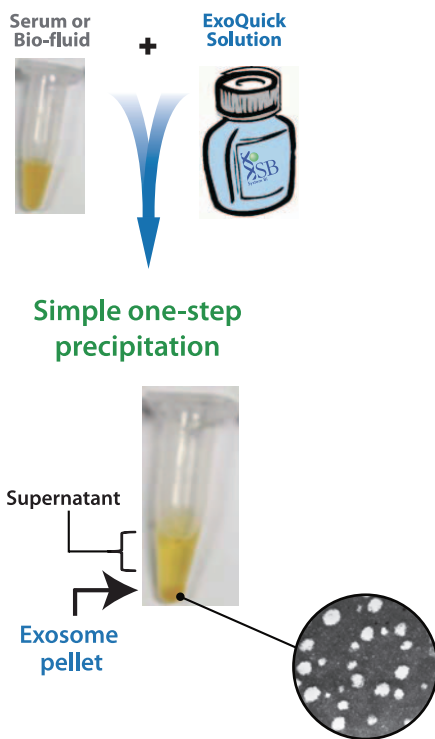


Exosomes 完全攻略

濃縮、分析，全部滿足！

Exosomes 為細胞經外吐作用 (exocytosis pathway) 所產生的小囊泡 (membrane vesicles)，顆粒直徑為 40 – 100 nm；在血液、尿液、唾液、羊水、腹水等動物體液，均有它的蹤跡。Exosomes 表面帶有特殊的蛋白質標記 (如 CD63、CD9、CD81 及 TSG101)，主要由造血細胞 (hematopoietic cells)、淋巴球細胞 (B & T lymphocytes) 及巨噬細胞 (macrophages) 分泌至體液裡；並有研究指出上皮層細胞 (epithelial cells) 及腫瘤細胞 (tumor cells) 亦會分泌大量 exosomes。Exosomes 除了負責蛋白質運輸 (protein trafficking)，在 2007 年文獻更指出可以運送 mRNA 及 microRNA，保護兩者不被 RNase 分解，進而影響鄰近細胞的蛋白質表現。由於 microRNA 在 exosomes 中大量存在，腫瘤細胞亦常大量分泌 exosomes，因此，microRNA 在 cancer therapy 逐漸成為新的癌化指標或治療方向；也因此，如何純化 exosomes 更顯得重要。

Step 1 ExoQuick Exosome Precipitation Solution – 濃縮 Exosomes



濃縮 exosomes 不再是難事

- 不需超高速離心
- 不需額外買 DynaBeads 及抗體
- 操作簡單，一小時內搞定
- 回收 exosomes 量最多
- 最少可用 100 μ l serum 或 bio-fluid 濃縮 exosomes

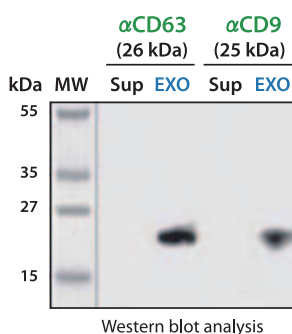
適用樣本有

- 血清
- 尿液
- Ascites fluids
- Spinal fluid
- Culture media

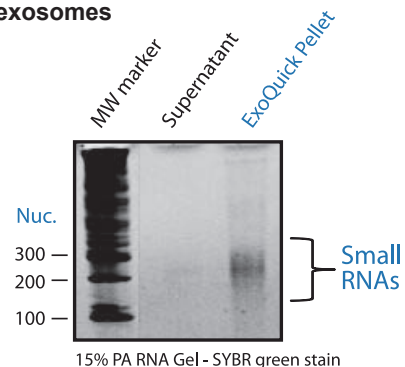
ExoQuick 與 bio-fluid 混合用量

Bio-fluid	Sample volume	ExoQuick volume
Serum	250 μ l	63 μ l
Ascites fluid	250 μ l	63 μ l
Bio-fluid	Sample volume	ExoQuick-TC volume
Urine	10 ml	2 ml
Spinal fluid	10 ml	2 ml
Culture media	10 ml	2 ml

利用 ExoQuick 從 250 μ l 人類血清濃縮 exosomes



以 Western blot 確認 exosome biomarker (CD63 and CD9) 表現量。

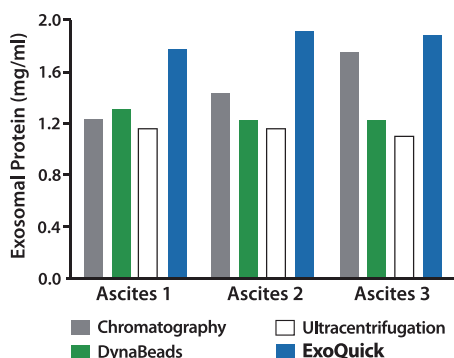


以 Trizol 萃取 exosome 中的 small RNA，跑 RNA gel，確認有 small RNA signal。

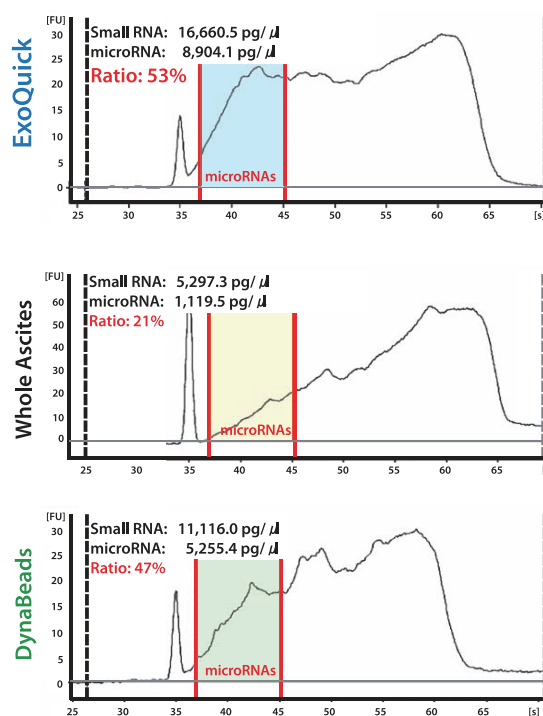
比較 **exosomal protein**、**microRNA** 產量

利用 ExoQuick、chromatography、ultracentrifugation 及 anti-EpCAM magnetic DynaBeads 純化 exosomes

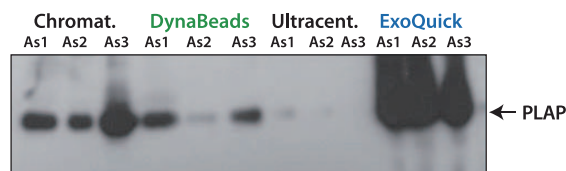
ExoQuick-萃取最多量的exosomal proteinis



ExoQuick-萃取最多量的exosomal microRNAs

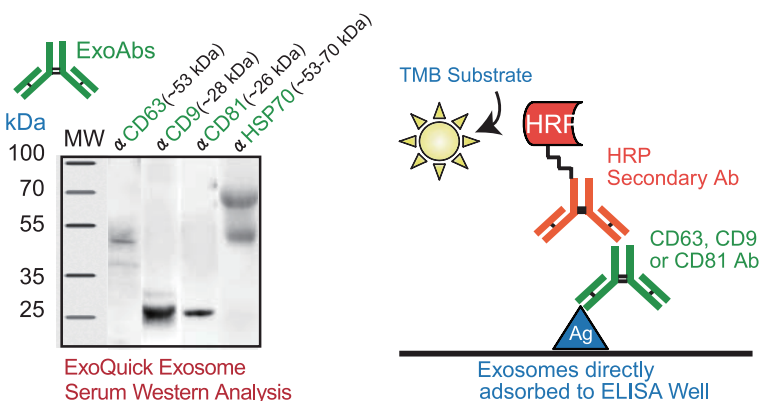


Placental Alkaline Phosphatase Biomarker Enrichment



Step 2 Exosome Antibodies and ELISA Kits – 分析、定量 Exosome Protein Markers

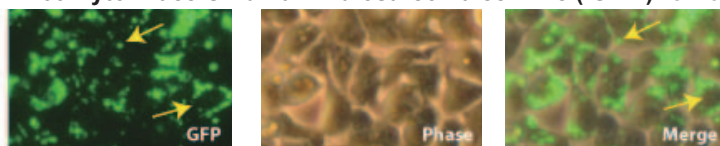
- 提供四種 **exosome markers** : CD63, CD9, CD81, Hsp70 (polyclonal antibody, 1:1000 dilution) ; 每組抗體均附二抗 (goat anti-rabbit HRP, 1:20,000 dilution)
- 提供三種 **ELISA kits** : CD63, CD9, CD81 ; 每組均附 **protein standard** , 可進行蛋白定量為 **96-well ELISA plate** 型式 (12 條 8 連排) , 操作方便



Step 3 Exosome CytoTracers – 照亮細胞裡的 Exosomes , 讓它無所遁形

- 觀察便利 : 利用 **GFP** 或 **RFP** 訊號 , 即時觀察 **exosomes** 。
- 彈性選擇 : 提供載體或現成病毒兩種型式。
- 篩藥武器 : 具有 **puromycin resistant gene** , 可篩選 **stable cell lines** 。

CD63 Cyto-Tracers Human Fibrosarcoma cell line (GFP) #CYTO120-PA-1



CD9 Cyto-Tracers HEK293 cells (GFP and RFP co-transfected)

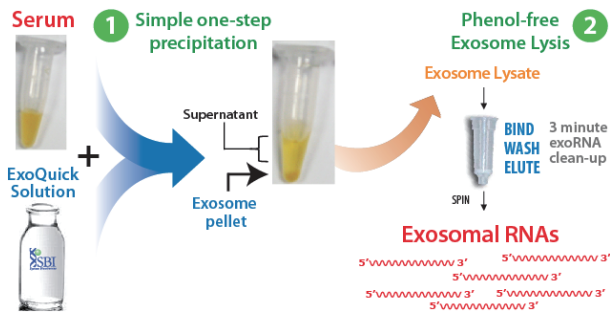


#CYTO123-PA-1

#CYTO122-PA-1

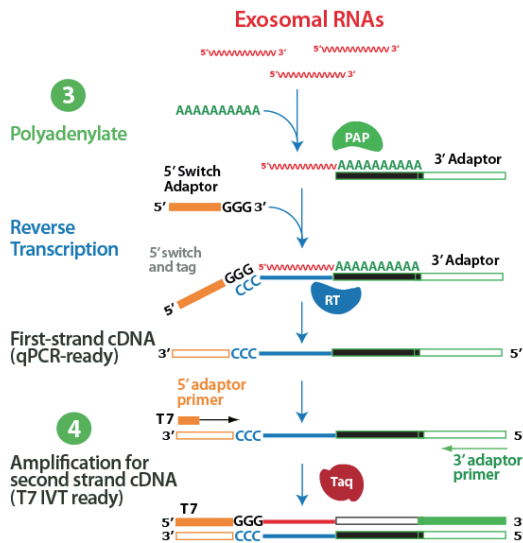
Step 4 SeraMir Exosome RNA Purification, Amplification Kit

利用 SeraMir Exosome RNA Purification Kit 純化 serum exoRNAs

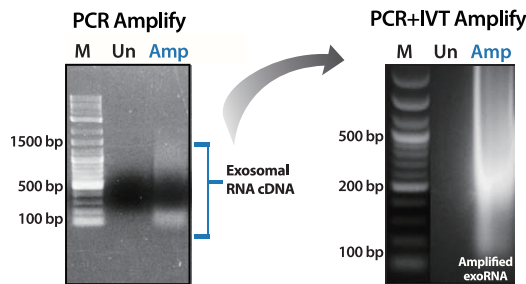


- 1 利用 ExoQuick one-step precipitation，濃縮 serum exosomes。
- 2 利用 phenol-free lysis buffer 及 spin columns，純化 exosome RNAs (exoRNAs)。

利用 SeraMir Exosome RNA Amplification Kit，將 exoRNAs 反轉錄為 cDNA



- 3 利用 polyA polymerase 於 exoRNA 3'end 添加 polyA tail；再添加 3' Adaptor、5'Switch Adaptor 及 RTase，進行反轉錄並形成 cDNA。此時的產物可進行 qPCR 相關實驗。
- 4 若想放大 cDNA 產量，可利用 SeraMir PCR amplification primer mix 以及 Taq polymerase，進行 PCR 反應。若想放大 sense exoRNAs 產量，可利用放大後 cDNA 以及 T7 RNA polymerase，進行 *in vitro* transcription。

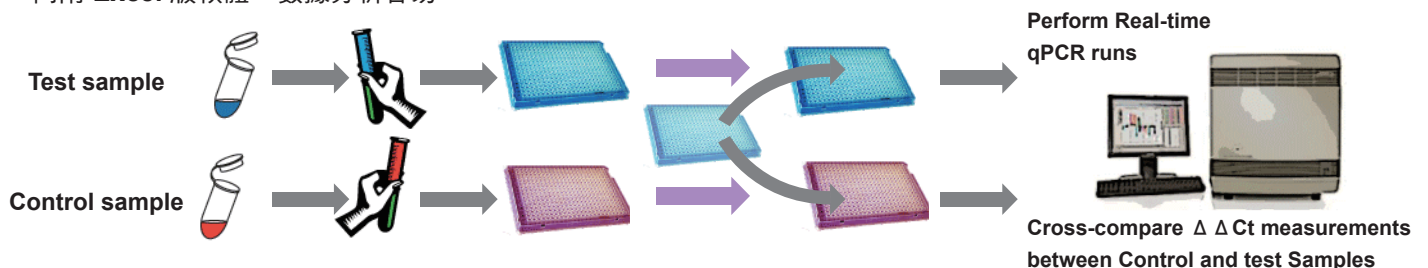


左圖：利用 PCR 反應放大 exoRNA cDNA 產量。

右圖：利用 T7 *in vitro* transcription 放大 sense exoRNAs，後續可做 Microarrays 以及 NextGen Sequencing。

Step 5 Exosome miRNA qPCR Profiler Assay Set – 一次偵測 380 種 miRNA 表現量

- 內含 380 種 miRNAs 及 3 種 control 5'primers
- 內附 Excel 版軟體，數據分析容易



準備 exoRNAs

將 exoRNAs 反轉錄成 cDNA

與 SYBR qPCR premix, 3' adaptor primer 混合，分裝到 384 孔盤

從 miRNA qPCR profiler plate 取 1 µl miRNA 5'primr，分裝到相對應的孔洞

進行 qPCR reaction

全面促銷 79折
2011.12.31 前

訂購資訊

SBI

Cat No	Product	Size
ExoQuick exosome 濃縮液		
EXOQ5A-1	ExoQuick exosome precipitation solution	5 ml (75 rxns for 250 μ l serum)
EXOQ20A-1	ExoQuick exosome precipitation solution	20 ml (300 rxns for 250 μ l serum)
EXOTC10A-1	ExoQuick-TC for Tissue Culture Media and Urine	10 ml (10 rxns for 5 ml culture media)
EXOTC50A-1	ExoQuick-TC for Tissue Culture Media and Urine	50 ml (50 rxns for 5 ml culture media)
Exosome 抗體		
EXOAB-C63A-1	Anti-CD63 Antibody (rabbit anti-human)	25 ul
EXOAB-CD81A-1	Anti-CD81 Antibody (rabbit anti-human)	25 ul
EXOAB-CD9A-1	Anti-CD9 Antibody (rabbit anti-human)	25 ul
EXOAB-Hsp70A-1	Anti-Hsp70 Antibody (rabbit anti-human)	25 ul
EXOAB-KIT-1	ExoAb Antibody Kit (CD9, CD63, CD81, Hsp70 antibodies, rabbit anti-human)	25 ul each
Exosome ELISA Kits		
EXOEL-CD63A-1	Exosome ELISA Complete Kit (CD63 detection)	96 reactions
EXOEL-CD81A-1	Exosome ELISA Complete Kit (CD81 detection)	96 reactions
EXOEL-CD9A-1	Exosome ELISA Complete Kit (CD9 detection)	96 reactions
Track Exosomes Using Cyto-Tracers		
CYTO120-PA-1	pCT-CD63-GFP (pCMV, CD63 Tetraspanin Tag, GFP signal)	10 ug
CYTO120R-PA-1	pCT-CD63-RFP (pCMV, CD63 Tetraspanin Tag, RFP signal)	10 ug
CYTO122-PA-1	pCT-CD9-GFP (pCMV, CD9 Tetraspanin Tag, GFP signal)	10 ug
CYTO123-PA-1	pCT-CD9-RFP (pCMV, CD9 Tetraspanin Tag, RFP signal)	10 ug
CYTO124-PA-1	pCT-CD81-GFP (pCMV, CD81 Tetraspanin Tag, GFP signal)	10 ug
CYTO125-PA-1	pCT-CD81-RFP (pCMV, CD81 Tetraspanin Tag, RFP signal)	10 ug
Exosome RNA Purification, Amplification Kits		
RA806A-1	SeraMir Exosome RNA Purification kit	20 preps (contains EXOQ5A-1 and 20 exoRNA columns)
RA800A-1	SeraMir Exosome RNA Amplification kit	20 reactions (contains RA806A-1 and others)
Exosome RNA Profiling Kits		
RA810A-1	Human SeraMir Exosome RNA 384 microRNA qPCR Profiler Assay Set	20 profiles
RA811A-1	Mouse SeraMir Exosome RNA 384 microRNA qPCR Profiler Assay Set	20 profiles
RA820A-1	Human Complete SeraMir Exosome RNA Amplification and Profiling Kit	20 profiles (contains RA800A-1, RA810A-1 and others)
RA821A-1	Mouse Complete SeraMir Exosome RNA Amplification and Profiling Kit	20 profiles (contains RA800A-1, RA811A-1 and others)

www.unimed.com.tw

2011, October - December Q4