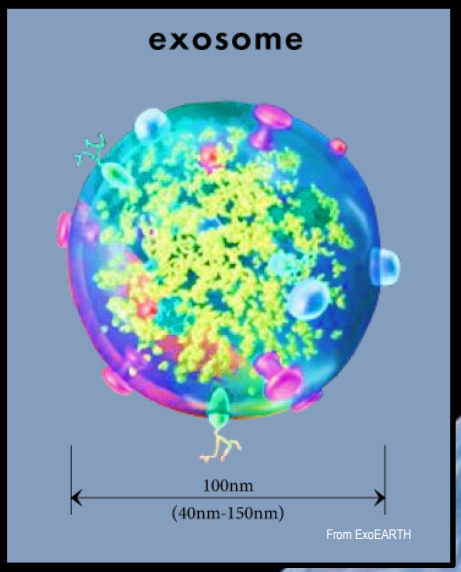


Much is yet to be understood about exosomes, and we are looking at the visible top of an iceberg, with most of what we have to understand about these nanovesicles still under the sea.

Biol Chem. 2013 Jan

解析 細胞泌密 EXOSOME

➢ 本期內容

- Exosome 樣品製備
- 六大純化法比較
- 分析與偵測應用
- 近期研究分享

友和 Uni-Onward Corp.

頁次

前言	Exosome & 純化流程簡介	1
樣品製備與初步處理	樣品生產 & 前處理	2
	初步過濾	3
Exosome 六大純化法	Exosome 六大純化法	4
	超高速離心 (UC) 與 梯度密度離心 (DGC)	4
	超濾 (Ultrafiltration) -濃縮管 & 切向流中空纖維管	5
	分子篩層析 (SEC) -複合式凝膠 Capto Core 700	6
	化學沉澱法 (Polymer Precipitation)	7
	親和性純化 (Immuno-affinity)	8
Exosome 偵測與分析	Western Blotting & IF -偵測 Exosome 常用抗體	9
	SEC-HPLC	9
	螢光標定法 – PKH	10-11
近期研究分享	Exosome 研究分享	12-13

■ 前言

Exosome的快速發展

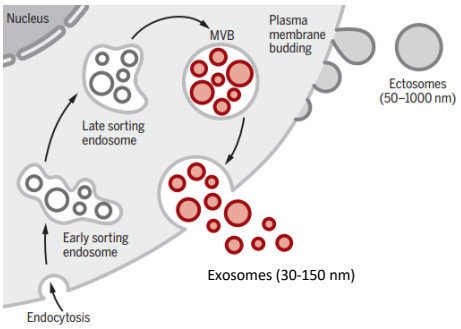
Exosome 又稱胞外體或外泌體，是一種從細胞分泌至細胞外的微小囊泡，被歸類於細胞外囊泡(Extracellular vesicles, EVs)，具有雙層脂質膜結構，粒徑約為30-150 nm，可由生物體內多種細胞主動分泌，如間質幹細胞(Mesenchymal Stem Cell)、免疫細胞、神經細胞等， Exosome攜帶大量特異性蛋白質(如細胞因子、生長因子)以及mRNAs、miRNAs，於跨細胞扮演訊息傳遞及生理調控，影響細胞遷移、促血管新生與抗腫瘤免疫等。

Exosome不僅存在於血液中，尿液、唾液、腹水甚至生活中飲用的牛乳、羊奶，也有Exosome的蹤跡，除了抽取生物體液外，也能透過細胞培養來大量製備。

近幾年癌症檢測與分析快速發展， Exosome被視為極佳的檢測替代物，用於取代cfDNA或循環腫瘤細胞(Circulating tumor cells, CTCs)，便是因為Exosome所攜帶的大量的核酸物質與蛋白質，以及廣泛存在的特點；

Exosome不僅被視為癌症早期診斷標的，更被開發作為無細胞的治療法，可達成藥物傳遞、癌症抑制、組織再生、免疫調節、醫療美容等。

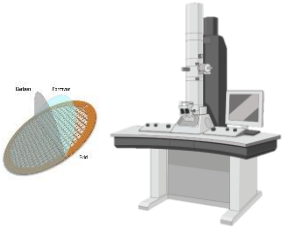
然而在實際應用中，如何獲取大量具完整結構及足夠純度的Exosome，是學界與產業仍在持續努力的課題。



Ref : *Science* . 2020 Feb 7;367(6478):eaau6977.

Exosome 純化流程簡介

Exosome樣品取得的來源非常多，但後續能夠使用的關鍵，在於能夠穩定得到足夠數量且大小分布均勻的Exosome，而這過程中需搭配不同的純化方法，以得到高品質的產物。而下列表格簡單敘述 Exosome的純化流程。

樣品前處理 ➡	初步過濾 ➡	純化選擇 ➡	偵測與分析
小規模 (~10ml 至 100ml以下)			
低速離心 初步分離細胞碎塊	利用0.45 μm 或 0.22 μm小飛碟過濾 	六大純化法 搭配使用 (參照P. 4)	西方墨點法 TEM電子顯微鏡 層析分析 流式細胞儀
大規模 (100ml 以上)			
初步分離細胞碎塊 再進行低速離心	利用 0.45 μm 無菌過濾杯過濾 		

如您有大規模樣品前處理與偵測耗材需求，詳洽業務

■ Exosome培養與低速離心

Exosome 量產利器! 多層細胞培養瓶

- 經特殊處理確保每層表面均一穩定
- 可在瓶內進行細胞與試劑的混勻操作以節省時間並降低汙染風險
- 採用 USP Class VI標準原物料，於 GMP 標準100,000 Clean room生產
- 符合ISO11137 Gamma滅菌，10^{-6} SAL
- DNase/RNase free，Non-Toxic，Non-Pyrogenic.

品 號	培養面積(cm^2)	包 裝
AGC-CF-600ML-VM-1CS	182T (單層)	5個/組，40個/箱
AGC-TCF012850-1CS	300T (單層)	3個/組，18個/箱
AGC-TCF012525-1CS	525T (175T*3層)	2個/組，12個/箱
AGC-TCF012875-1CS	875T (175T*5層)	1個/組， 8個/箱

結晶紫染色後可觀察到細胞在每一層均勻生長

樣品低速離心

不論樣品種類、採用哪種 Exosome 純化方法，樣品前處理與後續實驗進行，離心步驟都不可或缺。
下方離心機 (R) 型號，具冷卻系統可低溫離心，多種機型與轉子可供選擇，歡迎洽詢。

細胞/血液 低速離心機 5702 (R)

附 Rotor A-4-38

- Max. Speed: 3,000 xg (4,400 rpm)
- Rotor A-4-38 可依離心管選擇不同bucket

- 50 mL x 4 支、15 ml x 8 支
- 可搭配採血管
  直徑 13.5 mm x 16支/ 16 mm x 16支

多功能複合高速離心機 5910 (R)

- Max. Speed: 22,132 xg (14,000 rpm)
- 自動轉子辨識 & 不平衡測定
- 搭配不同 Adaptor 可至 1000 mL 之樣品前處理

■ 樣品初步過濾

小規模前處理 – 小飛碟[滅菌]

樣品低速離心後需進行過濾，濾除離心過程沒有排除的細胞碎塊

單顆滅菌包裝，另有0.45 μm 孔徑與不同膜材質

品號	膜材質	孔徑/直徑	包裝
AGC-F-PES022-13-100	PES	0.22 μm/13 mm	100 EA
AGC-F-PES022-30-45EA		0.22 μm/30 mm	45 EA
AGC-F-PVDF022-13-100	PVDF	0.22 μm/13 mm	100 EA
AGC-F-PVD022-30-45EA		0.22 μm/30 mm	45 EA

大規模前處理 – 無菌過濾杯組

- 過濾杯PES材質適合過濾初步離心後的樣品
- 除PES，另有PVDF、MCE、 Nylon與CA材質，0.1、0.22、0.45 μm 三種孔徑，跟100、250、500、1000 mL 四種體積可選擇

品號	膜材質	容量	孔徑(um)	規格	包裝
AGC-V-PES22-500-1CS	PES	500 mL	0.22	濾杯加承接瓶	12EA
AGC-V-PES045-500-1CS		500 mL	0.45	濾杯加承接瓶	12EA
AGC-VC-PES22-250-1CS		250 mL	0.22	單獨濾杯	24EA
AGC-VC-PES22-500-1CS		500 mL	0.22		
AGC-VC-PES45-500-1CS		500 mL	0.45		

低蛋白吸附離心管

- 樣品殘留率低，適合做為 Exosome 樣品製備、儲存。
- 螺蓋與壓蓋品項均可耐受 17,000 x g 轉速。

eppendorf

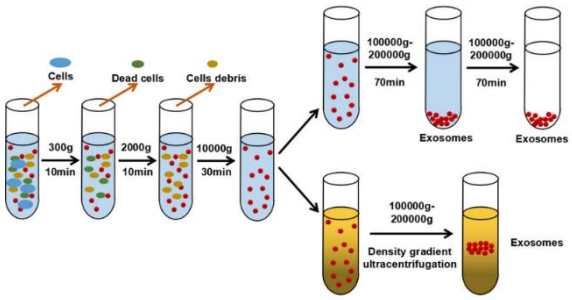
規格		品號	包裝
壓蓋	0.5 m	0030108094	50 支*2 包
	1.5 mL	0030108116	
	2.0 mL	0030108132	
	5.0 mL	0030108302	
螺蓋	5.0 mL	0030122356	100 支*2 包
	15 mL	0030122216	50 支*4 包
	50 mL	0030122240	

■ Exosome 六大純化法

完成樣品初步離心與過濾後，可透過六大分離法，進一步純化 Exosome

六大分離方法	優點	缺點	所需時間	純度	產率	需求產品型式
超高速離心 (UC) Ultra-centrifugation	黃金標準 方法成熟相對便宜 最多reference引用	操作麻煩 可能損傷 Exosomes	> 4h	中	中	超高速離心機
梯度密度離心 Density gradient centrifugation	純度高 能避免損傷 Exosomes	耗人力、耗時 配置梯度較繁複	>16h	高	低	梯度密度試劑
超濾 (UF) Ultra-filtration	操作簡單，不需用到高額設備和試劑	膜孔容易堵塞 易損失較小粒徑 Exosomes	< 4h	高	中	蛋白濃縮管
分子篩層析 (SEC)	Exosomes 功能跟結構可保持 快速進行大體積製備	需特殊管柱及層析儀 可能有 lipoprotein混入	0.3 h	高	高	SEC column
化學沉澱法 Polymer Precipitation	操作簡單，適用於小量樣品純化	可能被沉澱的聚合物或化學品污染	0.3-12h	低	高	各品牌試劑組
親和性純化法 Immuno-Affinity	高專一性純化 不同亞型Exosomes	較昂貴之方法 需仰賴抗體的專一性	4-20h	高	中	抗體修飾之磁珠或膜

超高速離心(UC)與梯度密度離心



Ref: Chembiochem . 2019 Feb 15;20(4):451-461.

- **超高速離心** 為目前研究期刊中，最常出現的使用方法，但在超高速離心過程可能對Exosome造成物理完整性的破壞，再者，UC 法能處理的體積會受限於設備，並不是放大產能的最佳選擇。

- **梯度密度離心** 利用溶液不連續密度的差異，將雜質與 Exosome 在離心過程中逐步分開，僅需使用 OptiPrep™ 與蔗糖調配梯度，便能進行實驗。

超高速落地式離心機
Eppendorf Himac CP80NX

- Max. Speed: 615,000 xg (80,000 rpm)
- 可用於超高速離心 與 梯度密度離心
- 搭配不同 Adaptor 可至 40 mL x 6瓶



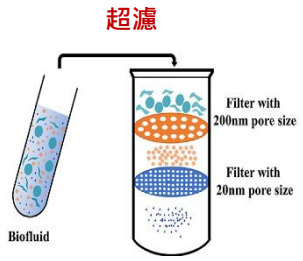
梯度密度離心推薦商品

OptiPrep™ Density Gradient Medium
#D1556, 250 mL

Sucrose
#S0389, 500 G

超濾

其原理利用不同截留分子量(MWCO)的超濾膜來進行分離，可保留比膜孔大的 Exosome，排除比膜孔小的蛋白質或核酸雜質，單次實驗下處理樣品體積相當彈性，純化過程也不須用到昂貴儀器。超濾目前常見的產品應用形式為濃縮管過濾與切向流過濾(Tangential Flow Filtration, TFF)，兩種產品有各自的特點與使用方法的差異。



Ref: *Front Bioeng Biotechnol* . 2022 Jan 5;9:811971

• 濃縮管過濾

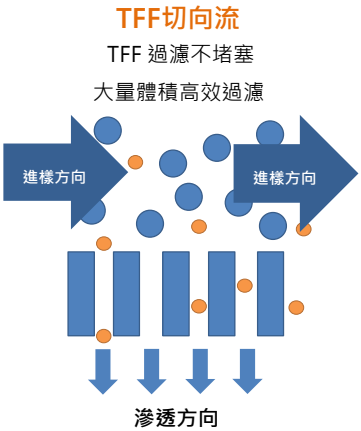
透過選擇不同截留分子量的濃縮管，如 100KDa 或更小 MWCO 之離心管進行濃縮。
推薦細胞培養來源使用，樣品前處理完成後便能用濃縮管進行純化。然而傳統濃縮管是垂直式端點 (Dead end)的設計，在離心過程中樣品受力方向與濾膜垂直，濃縮一段時間後會有堵塞的情形，可能造成部分 Exosome 損傷， Vivaspin 獨有的垂直膜設計與專利dead-stop技術，相較傳統濃縮管有著更加的過濾速率、低阻塞率以及避免過度離心而造成的蛋白質失活情況。
除了下列表格，另有更多MWCO可供選擇。

品號	品名	體積
28932361	Vivaspin 20, MWCO 30K	20 mL
28932363	Vivaspin 20 MWCO 100K	20 mL
28932317	Vivaspin 6, MWCO 30K	6 mL
28932319	Vivaspin 6, MWCO 100K	6 mL

• 切向流過濾 (TFF)

切向流純化的特點在於讓樣品水平流動於膜表面，使受力方向與濾膜平行，樣品中小分子穿過膜孔被收集至一處，而剩餘滯留在濾膜內的較大分子則會被反覆循環注入，達到樣品濃縮的效果。因此在面對樣品體積大又想高效率純化的情形，非常適合採用TFF法，上樣體積可從數百毫升至公升級。此外，TFF過程中液體流動如掃帚般掃過濾膜，可減少樣品堵塞過濾膜的狀況，可大幅提高濾膜使用率。常見產品形式主要有中空纖維管(hollow fiber; cartridge)與卡匣式 (cassette)。

下方列出兩系列中空纖維管產品: MidGee 與 Xampler。MidGee 可處理 約 200 mL 樣品，轉接頭均為Luer-Lok，可用針筒手動操作或蠕動幫浦進行純化。Xampler Cartridge之膜表面積比 MidGee 更大，可處理幾百毫升至五公升樣品，轉接頭均為 0.375 in Tubing nipple，推薦以蠕動幫浦進行純化。除了Exosome外，切向流也常用於核酸、蛋白質、微脂體、類病毒顆粒(VLP)等生物大分子濃縮/滲濾。

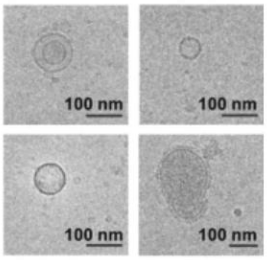


品號	品名	膜表面積	截留分子量
UFP-100-C-MM01A	MidGee Ultrafiltration Cartridge	26 cm^2	100K
UFP-300-C-MM01A			300K
UFP-100-C-3MA	Xampler Ultrafiltration Cartridge	140 cm^2	100K
UFP-300-C-3MA			300K
UFP-100-C-3X2MA		290 cm^2	100K
UFP-300-C-3X2MA			300K

分子篩層析

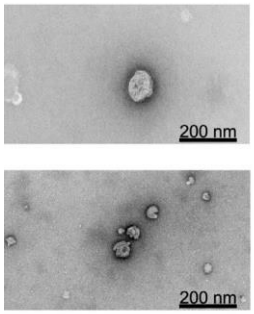
分子篩層析(SEC)是除了超高速離心外，被眾多學術期刊採納的純化方法: 將多孔狀球狀凝膠充填成管柱，利用不同大小分子流經管柱內凝膠孔洞會產生路徑長短差異，而達到依分子大小分離的效果。此純化過程對 Exosome 傷害小，可以保留本身結構，還能獲得較高純度，更因為分子篩層析的可重複性與穩定性，適合由小規模進到大規模量產製備。純化可用拋棄式空管自行加入分子篩填料，或是購買預裝管柱進行純化。Exosome 分子量平均為 500KDa，下表凝膠或預裝柱皆適用於其純化，顆粒越細分離效果越好。

品名	品號	包裝	分離效果	最大上樣體積
Sepharose CL-4B	17015001	1L	普通	N/A
Sephacryl S-400 HR	17060910	150mL	普通	N/A
HiPrep 16/60 Sephacryl S-400 HR	28935604	1EA	佳	5 ml
Superose 6 Increase 10/300 GL	29091596	1EA	佳 ~ 優	500µL
HiLoad 16/600 Superdex 200 pg	28989335	1EA	優	5 mL
HiLoad 26/600 Superdex 200 pg	28989336	1EA	優	13 mL



CL-4B 純化結果

Ref: *Scientific Reports.* 2017; **7**: 15297.



Superdex 200 純化結果

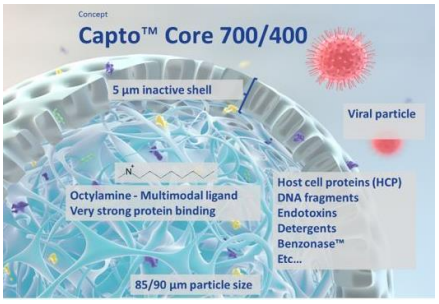
Ref : J Proteomics . 2014 Jun 25;106:46-60.

上樣體積高出30倍! Capto Core 複合式凝膠

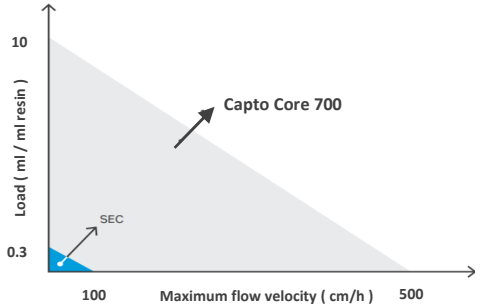
Capto Core 複合式凝膠粒子，除了與一般分子篩凝膠一樣具有特定大小的孔徑，能排除(分離)不同大小的分子，還因粒子內層修飾了疏水性及帶正電的配基(根據溶液pH值所產生之電性)，而能吸附進入凝膠內的蛋白質或核酸雜質 (圖 a)。根據以上特性， Capto Core 700 與傳統分子篩相比能在單次純化實驗加入更多樣品，並用較高流速進行純化 (圖b)。

圖(C) 為使用Capto Core 700 預裝管柱純化 Exosome 之流程範例。可用針筒上樣，操作簡易。先以超濾法將樣品濃縮至 50 µg/mL，然後加入 HiTrap Capto Core 700 (以 5 mL 1x PBS 平衡完成)，接著加入 1.0 mL 的 PBS 沖提，以 96 孔盤每孔約 35 µL 收取流出管柱的樣品，進行後續分析。Capto Core 400/700 亦適合腺病毒(AAV) 等大型生物分子純化。

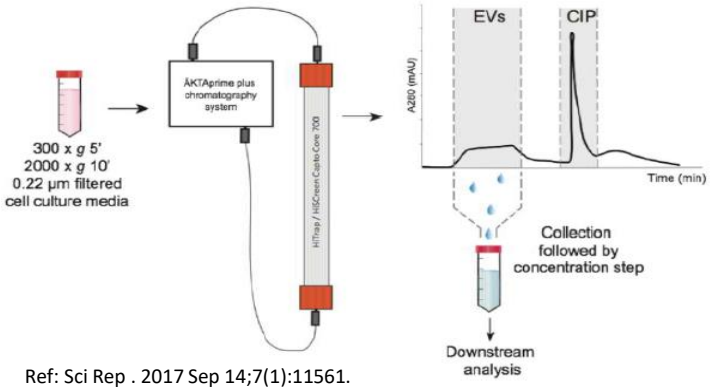
(a)



(b) 比較 SEC gel 與 Capto Core 700 上樣量與流速差異



(C) Exosome 純化簡易流程圖



Ref: Sci Rep . 2017 Sep 14;7(1):11561.

品名	體積	品號
Capto Core 700	25 mL	17548101
	100 mL	17548102
HiTrap Capto Core 700	5 × 1 mL	17548151
	1 × 1 mL	29400461
HiScreen Capto Core 700	1 x 4.7 mL	17548115

化學沉澱法

樣品量少且數量多時，建議使用化學沉澱法，不需昂貴儀器或繁複的操作，僅需在樣品前處理之後，依照操作流程進行實驗，便能以高產率獲得 Exosomes。

MedChemExpress 的化學沉澱法試劑組，可用於細胞培養、血清/血漿、體液三種常見樣品。

品號	樣品類型	可純化次數	沉澱試劑體積
HY-K1062	cell culture media	20 test	100 mL
HY-K1063	plasma and serum	30 test	30 mL
HY-K1065	body fluids	30 test	30 mL

每一試劑組均包含沉澱試劑與 Purification Filter

操作步驟

STEP 1. 樣品為新鮮收集的樣品先放置冰上，樣品為冷凍先以25℃水浴回溫後置於冰上

STEP 2. 依照說明書建議之樣品體積進行離心 (3,000 g, 4°C) 十分鐘，以去除細胞碎塊

STEP 3. 吸取上清液，置於新的濃縮館內，再次離心 (10,000 g, 4°C) 十分鐘，收取上清液

STEP 4. 加入試劑組中的沉澱試劑 (加入體積請參考試劑組內之說明書)

STEP 5. 震盪一分鐘進行混勻，並置於冰上孵育2小時。注意: 延長孵育間可以提升 Exosome 產率，但不建議超過24小時

STEP 6. 離心(10,000 g, 4°C) 六十分鐘後，移除上清液，此時Exosome會在沉在離心管底部

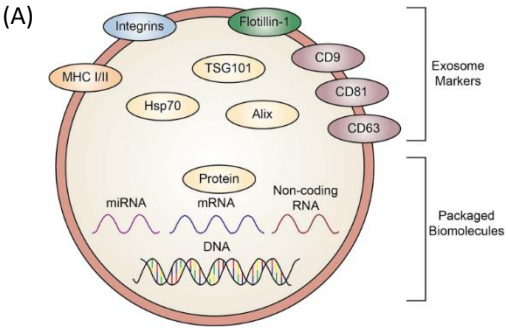
STEP 7. 1x PBS加入體積參考上方表格，加入PBS後重新懸浮樣品，並離心 (12,000 g, 4°C)兩分鐘，此時Exosome會在上清液

STEP 8. 將得到的Exosome加到 Purification Filter (包含於試劑組中)，並離心 (3,000 g 4°C)十分鐘

STEP 9. 收集過濾後的Exosome，直接進行後續實驗，或分裝成多管保存於 -80°C，並避免反覆凍融。

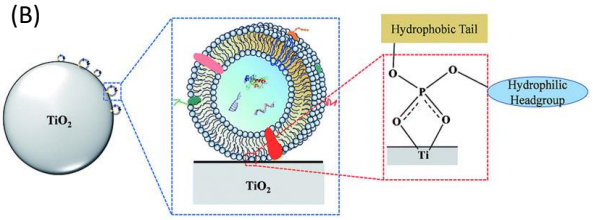
親和性純化法

常用方法為利用抗體的免疫親和性做為純化原理，將能辨認 Exosome 表面之跨膜蛋白 CD9、CD63、或 CD81 的抗體，接合於球狀樹脂，磁珠或是奈米金屬 (如氧化鐵、奈米金)等粒子表面，而能將樣品中 Exosome 分離純化出。此法是目前眾多純化方法中可得到最高純度 Exosome 的方法，然而高昂的抗體成本也是此項技術無法普及的主因。在純化後的實驗中，也經常使用到能辨認 Exosome Markers的抗體，相關抗體品項可參考下頁。



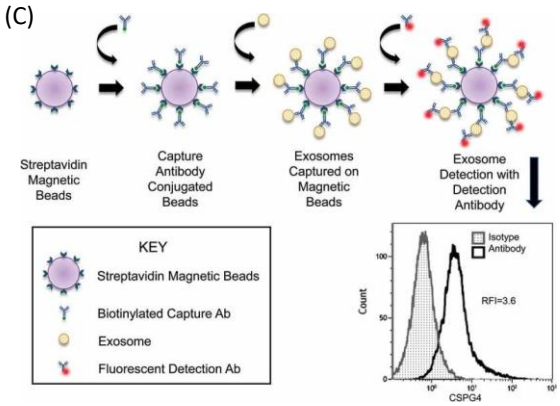
Ref: Molecular Cancer volume 18, Article number: 52 (2019)

除了抗體的免疫親和性，也有研究團隊利用 TiO_2 會與磷酸基團產生親和力的特性，將 Exosome 捕捉下來 (圖B)。電性、親疏水性等性質也被應用於 Exosome 純化，並被開發成微流體晶片形式，僅需少量樣品便能進行檢測。



Ref: *Chem Sci*. 2019 Feb 14; 10(6): 1579–1588.

利用帶有 Streptavidin 磁珠作為載體，加入以 Biotin 標定之抗體使其結合至磁珠表面，因抗體能專一性辨認 Exosome 表面蛋白而能捕獲 Exosome，後續可再進一步以螢光標定的抗體偵測，進行流式細胞儀或其他螢光實驗，詳細可參考圖 C 之文獻。此外，也可針對特定細胞所分泌之 Exosome Marker，找到相對應的抗體來進行純化，在未來特定疾病檢測應用上具有相當大的潛力。



Ref: *J Extracell Vesicles*. 2018; 7(1): 1435138.

Streptavidin 與 Biotin 的親和特性目前已非常普遍的被應用，下方Streptavidin 磁珠品項，可透過加入帶有biotin之抗體，接著加入實驗樣品進行 Exosome純化實驗。
另有NHS Mag Sepharose 可透過將抗體接到磁珠上後來純化 Exosome。

品號	樣品類型	包裝	規格
28985738	Streptavidin Mag Sepharose	2 × 1 ml 10% slurry	>300 µg biotinulated BSA/ml of medium slurry
30152103010150	Sera-Mag™ Streptavidin	5 mL	2500 to 3500 (Low) pmol/mg
30152105010150	Sera-Mag™ Streptavidin	5 mL	4500 to 5500 (High) pmol/mg
11418165001	Biotin Protein Labeling Kit	1 Kit	sufficient for 5 labeling reactions

■ Exosome 分析

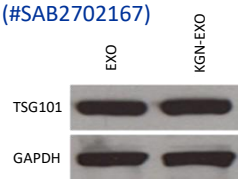
為了確認樣品中Exosome純度，最常見的分析與偵測方式，包含西方墨點法、SEC、NTA (Nanoparticle tracking analysis)、 Cryo-EM(Cryo-electron microscopy) 等，來確定 Exosome 的基礎表徵。

Western Blotting & IF

偵測 Exosome 常用抗體

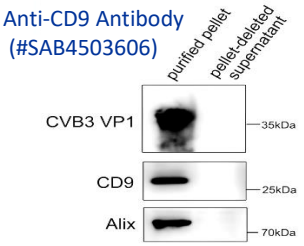
品名	應用	品號	包裝
Positive Markers			
Exosome Protein Detection Kit (包含CD63和TSG101抗體)	WB	HY-K1064	5 test
Anti-TSG101	ELISA, FACS, IF, IHC, WB	SAB2702167	100 UL
Anti-CD63	IHC, WB	SAB4301607	100 UL
Anti-CD9	ELISA, IF, IHC, WB	SAB4503606	100 µG
Anti-CD9	FACS	SAB4700092	100 µG
Anti-CD81	ELISA, IF, IHC, WB	SAB3500454	100 µG
Anti-ALIX/PDCD6IP	FACS, IF, IP	SAB4200646	100 µL
Anti-ALIX (C-terminal)	IF, IP, WB	SAB4200477	200 µL
Negative Markers			
Anti-GM130	WB, IP, IHC	G7295	200 µL
Anti-Calnexin	WB, IP, IHC	C4731	25 µL
Anti-Lamin B1	WB, ELISA	ZRB1143	25uL

Anti-TSG101 Antibody (#SAB2702167)



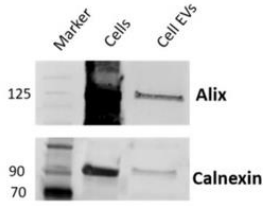
Ref: Stem Cells Int. 2021; 2021: 6624874.

Anti-CD9 Antibody (#SAB4503606)



Ref: PLoS Pathog . 2023 Jan 12 ;19 (1) : e1011090

Anti-Alix Antibody (#SAB4200477)



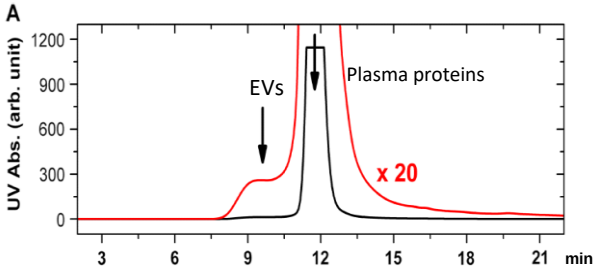
Ref: J Extracell Vesicles. 2022 Sep; 11(9): e12251

SEC-HPLC

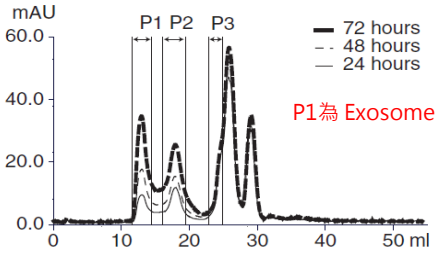
使用 Cryo-EM 或 NTA分析前，進一步細分樣品內不同粒徑大小的分子。

品名	品號	可分析的大小和直徑
TSKgel® G4000 SWXL, 7.8 × 300 mm	8542	10 - 50 nm
TSKgel® G5000PWX, 7.5 x 300 mm	5764	10 - 100 nm
TSKgel® G6000PWX, 7.8 × 300 mm	21875	10 - 200 nm

Column: TSKgel G6000PW



Column: TSKgel G4000SWXL

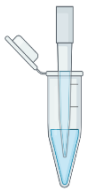


螢光標定法 – PKH

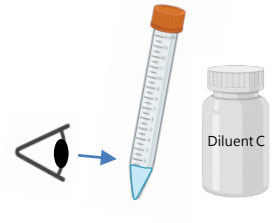
PKH26和PKH67螢光細胞連接染劑套組可以在長時間對活細胞進行螢光標記。這些染劑能選擇性結合到雙層脂質上的特性，近年來也有許多研究利用染劑偵測Exosome。下方介紹如何用 PKH 螢光染劑對Exosome進行螢光標記，以進行微小囊泡追蹤實驗。

Exosome 螢光標定步驟

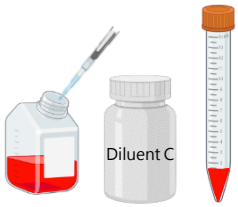
STEP 1. 將新鮮分離出的 Exosome pellets 收集到同一離心管中，並將離心機預冷(2-8 ℃)



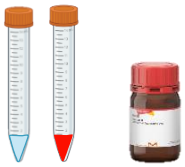
STEP 2. 測量樣品總體積，並用螢光染劑套組的Diluent C 將樣品體積增加到 1ml



STEP 3. 準備對照組，加入與實驗組相等體積的 Exosome free medium 用 Diluent C 補到1ml



STEP 4. 分別在實驗組與對照組加入6 µL PKH 螢光染劑



STEP 5. 通過 pipette輕輕吸取混合 30 秒。在室溫下靜置 5 分鐘

STEP 6. 加入含有2mL 10% BSA (A9418)的 PBS 溶液中來終止反應，並加入serum-free media將體積提高至 8.5 mL。

STEP 7. 準備0.97M 蔗糖水溶液，緩慢小心地於試管底部添加 1.5mL 蔗糖

STEP 8. 在低溫下以 190,000 xg 離心 2 小時

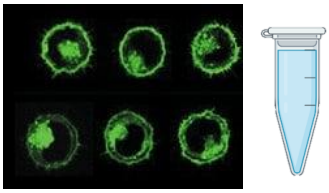
STEP 9. 小心吸出上清液，避免吸到沉澱，用1xPBS 1ml重新懸浮 Exosome

STEP 10. 樣品轉移至濃縮管後，再加入9 mL PBS 與 0.75 mL media

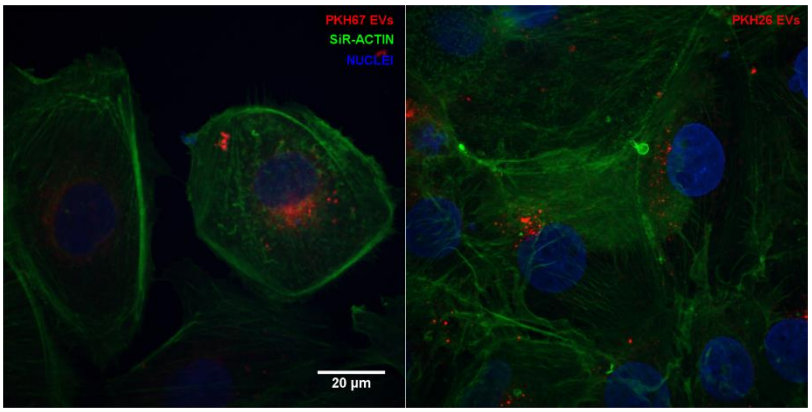
STEP 11. 高速離心機中以 3000 xg 離心40 分鐘，如果需要繼續離心，以短時間(20分鐘內)多次將體積濃縮至 0.5-1 mL

STEP 12. 回收濃縮管內樣品，移至冰上的微量離心管。盡快使用標記的外泌體，以確保螢光強度

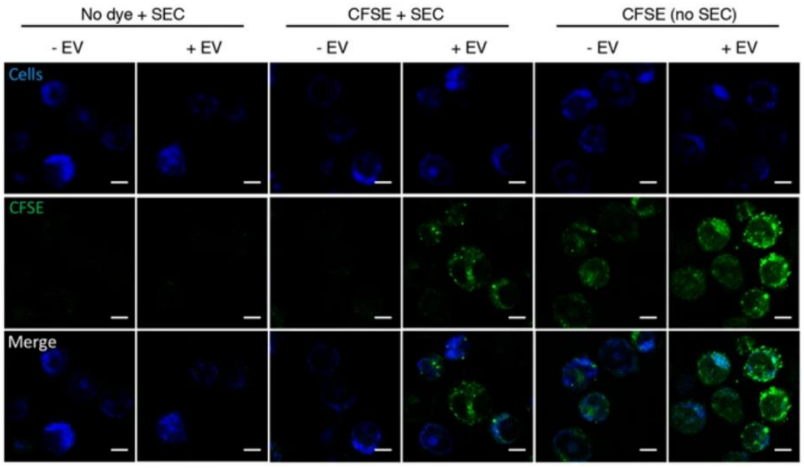
低溫避光保存



Exosome 螢光標定結果



左圖中，PKH67 和 PKH26 標定後的細胞外囊泡(EV)，與細胞培養九小時後，能透過共聚焦顯微鏡觀察到外泌體進入細胞內。
紅色為螢光標定的外泌體。
Ref : *Scientific Reports* **volume 10**, Article number: 6494 (2020)



左圖中，以CFSE標定EV，利用共聚焦顯微鏡進行觀察，綠色為螢光標定的EV，SEC為螢光標定的EV後是否經過分子篩層析，來排除游離的CFSE。

Ref : *Scientific Reports* **volume 7**, Article number: 1878 (2017)

品號	品名	螢光波長	包裝
MINI26	PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini	λ_{ex} 551 nm; λ_{em} 567 nm	25 rxn
MINI67	PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit	λ_{ex} 490 nm; λ_{em} 502 nm	25 rxn
MINCLARET	CellVue® Claret Far Red Fluorescent Cell Linker Kit	λ_{ex} 655 nm; λ_{em} 675 nm	25 rxn
21888	CFSE	λ_{ex} 492 nm; λ_{em} 517 nm	25 MG
SAE0193	**Exosome standards**, fluorescent (1 x 10^9 particles)	λ_{ex} 488 nm; λ_{em} 507 nm	1 VIAL

Exosome standards 可做為positive control，利於排除實驗操作問題
標定後除了利用蔗糖的密度差異與高速離心排除游離螢光分子，也可用 illustra™ MicroSpin™ G-25 (27532501) 快速移除游離螢光分子

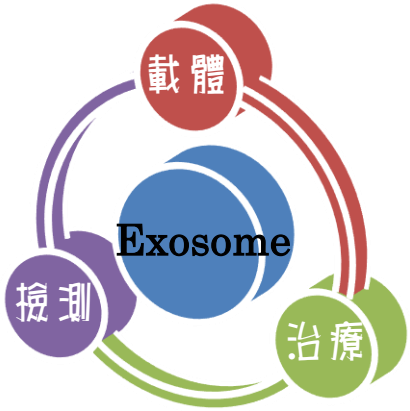
Ref : *EBioMedicine*. 2021 Feb; 64: 103208.

標定過程所需其他品項

品號	品名	品號	品名
A9418	Bovine Serum Albumin	D8537	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
S1888	Sucrose	28932360	Vivaspin 20, MWCO 10K

■ 近期研究分享

Exosome



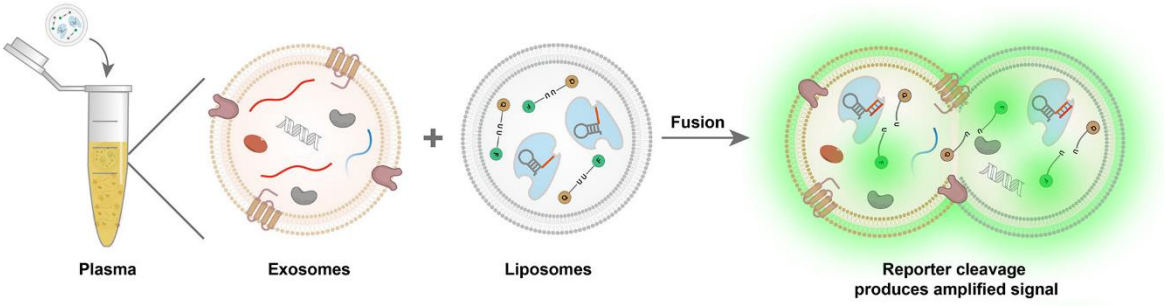
是近幾年被高度關注的主角之一。在過去的研究中，這些從細胞分泌出來的小囊泡一直被認為裝載著細胞不要的廢物，如今卻變成炙手可熱的研究主題，Exosome不僅乘載著細胞間重要的信號分子，如DNA、miRNA等，而其後續的應用更是潛力無窮，而國際細胞外囊泡協會(ISEV)更是制定了MISEV Checklist，提供Exosome研究的最低實驗要求，提高未來各個研究學者對Exosome研究結果的可重複性。

細胞間的溝通使者 – Exosome x COVID-19

知名期刊Nature在去年12月發布了一篇文獻，發現Exosome會影響COVID-19病人的促炎反應(Proinflammatory immune response)。作者發現受COVID-19感染的病人的血漿中分離出來的Exosome，含有SARS-CoV-2的dsRNA，而刺激了周邊單核細胞產生IL-6、IL-8、TNF-α等發炎因子，證明病人感染SARS-CoV-2後的細胞分泌出的Exosome會影響其免疫反應，可能進而關係到COVID-19的病程發展、嚴重程度與長期相關症狀的關係。*[Nature, 2022, 12: 21779]*

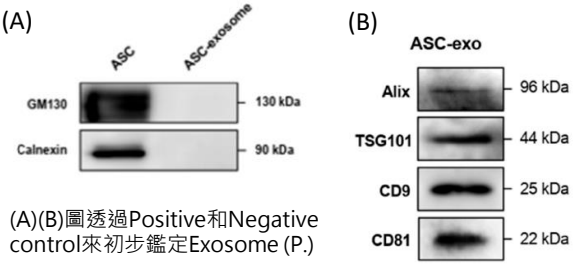
檢測 – Exosome x CRISPR

而Exosome所攜帶的mRNA在癌症生物學中扮演著關鍵的角色，被認為是癌症診斷的潛在生物標誌，Exosome也常常被拿來當作疾病檢測的工具，其中最大的好處即是可以免除傳統式較侵入性的取樣，只需要抽血即可。而聰明的科學家更將CRISPR基因編輯的技術帶入，來檢測病人血漿中Exosome中少量癌症相關的miRNA，還能有效區分惡性與良性樣本。 *[ACS Sens. 2023, 8, 2, 565-575]*



治療 – 預防與緩解皮膚炎

而在2020年，Cells期刊中也表明，從人類脂肪間質幹細胞所分泌出來的Exosome通過促進神經酰胺的合成來恢復Atopic Dermatitis (AD) 異位性皮膚中的表皮屏障功能，亦有效降低因AD而導致的炎發炎因子。*[Cells 2020, 9, 680]*



(A)(B)圖透過Positive和Negative control來初步鑑定Exosome (P.)

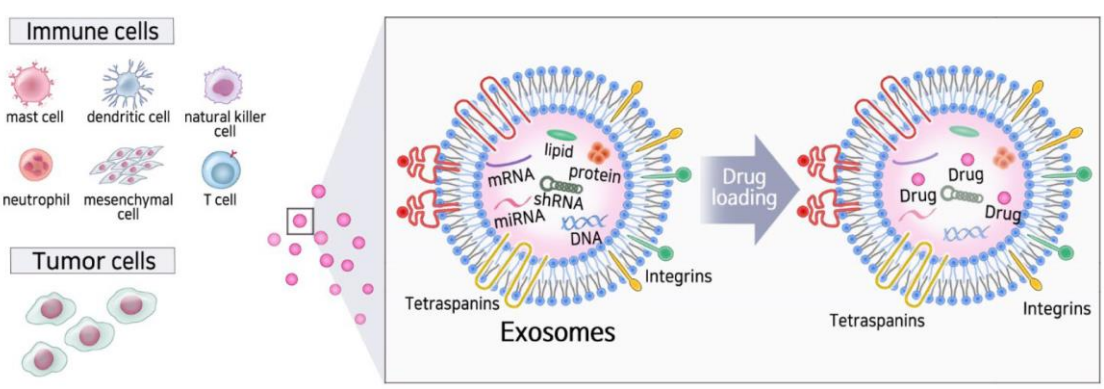
小鼠Treat Exosome後，皮膚10日後有效緩解症狀

■ 近期研究分享

載體 – Exosome x Drug Delivery

將Exosome作為傳遞治療藥物的平台已經在臨床前和臨床試驗中獲得驗證。而在奈米技術的領域中，設計具有特異性標靶的載體是藥物傳遞的黃金標準，而Exosome除了是奈米等級之外，又可以從不同體液、細胞中萃取，所以在對於與生物相容性上，會比其他奈米藥物還要更易於臨床前的檢測與應用。[*Cells 2022, 11, 316]* 圖A, 不同的細胞型態如DC, T cells, Tumor cells皆會分泌Exosomes。

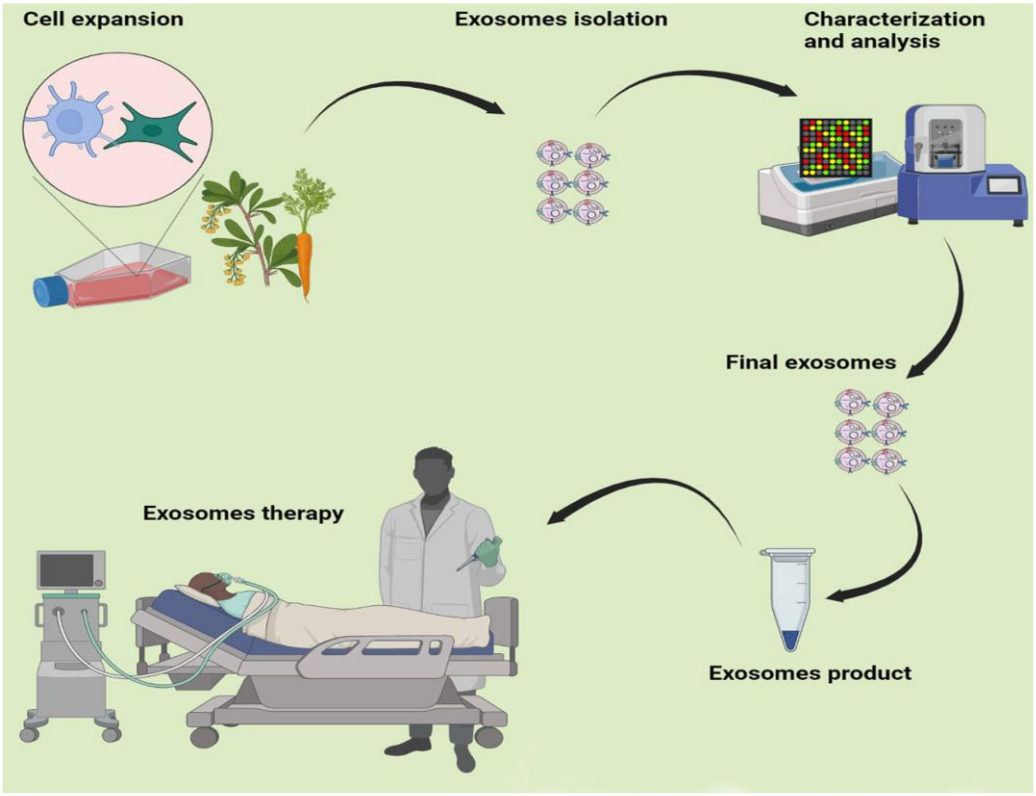
(A)



結語

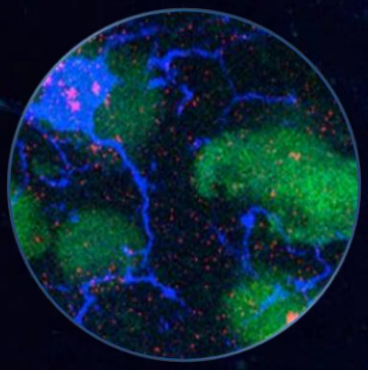
近年來，研究學者們越來越關注細胞衍生物(如Exosome)的治療，而不是幹細胞本身，因為已有相關研究初步證實幹細胞的Exosome與幹細胞具有相同的治療和臨床益處，而供臨床研究使用的Exosome，製作流程皆需符合GMP標準，才能進入人體使用。

然而，有研究指出，最常使用的MSCs所分泌的Exosome，在某些情況下還是被認為是一把「雙刃劍」。雖然研究與臨床上有許多令人滿意的結果，但相反的，Exosome的安全性、副作用和不良結果等資料，都尚未全面，在Exosome如火如荼發展的時代，其藥物本質的安全性與功效，還是得經過更詳細的審視，才能順利的在未來造福需要的人。 [*Cell Communication and Signaling (2022) 20:145*]



Exosome

追蹤分析必備利器



Confocal microscope
PKH26/PKH67

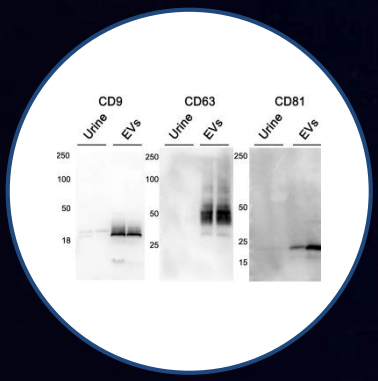
螢光染劑可存在於活細胞三個月

細胞、動物實驗都可用

SEC-HPLC column
TSKgel G4000 SWXL

分析、偵測與後續生物實驗

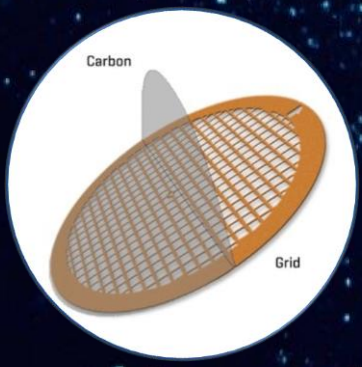
確認Exosome 均質性很重要



Western blotting
CD9, CD63, CD81

Exosome 更多相關抗體

請見 P.9 或洽詢各區業務



Formvar/Carbon Supported Copper Grids

鍍碳銅網載片讓 Exosome

在電子顯微鏡下一目了然

友和貿易股份有限公司
UNI-ONWARD Corp.
客服專線：(02)2600-0611

◆台北 TEL:(02)2600-6699 FAX:(02)2600-0799
◆新竹 TEL:(03)658-0508 FAX:(03)658-0509
◆台中 TEL:(04)2355-2008 FAX:(04)2355-2006
◆嘉義 TEL:(05)277-2262 FAX:(05)277-2263
◆台南 TEL:(06)249-5488 FAX:(06)249-5499
◆高雄 TEL:(07)374-8686 FAX:(07)374-8585
◆花蓮 TEL:(03)836-0065 FAX:(03)836-0075
www.uni-onward.com.tw