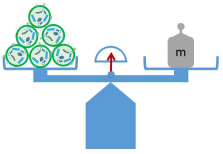

产品使用说明书

总外泌体捕获和定量试剂盒

人血浆

Total Exosome Capture & Quantification Kit

For human plasma

Cat# RGEXOP100-1

辽宁润基生物科技有限公司

Liaoning Rengen Biosciences Co.,Ltd

Version 1.0

01/7/2018

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

数据结果分析.....7

性能分析.....8

相关产品信息.....9

常见问题 10

技术支持.....11

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，血浆 100μl/孔可直接检测。

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。

5、**本产品只用于科学研究，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 的胞外膜性囊泡（Extrocellular Visicles，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）等外的液体活检的另一种选择。

总外泌体捕获和定量试剂盒，不仅能够定性或定量检测不同生物标本中外泌体颗粒的数量，同时也可以检测样本中外泌体表面感兴趣蛋白质的表达。此试剂盒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实验（ELISA）技术，抗人总外泌体相关抗原的特异单克隆抗体预包被酶标板上，可直接捕获样品和标准品中外泌体颗粒，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。颜色反应深浅不仅与样本中外泌体的浓度成正比，与外泌体表面待检抗原的数量成正比。加入终止液终止反应，在 450nm 波长测定吸光度值（OD 值），从标准曲线方程中可计算外泌体的浓度。

试剂盒组成和说明

包装规格：96 人份/盒，标本类型：人血浆

产品组成 Cat# RGEXOP100-1	容量	保存条件
样本稀释液（Sample Buffer）	35ml	2-8℃
25×洗涤液（Washing Buffer 25×）	35ml	2-8℃
显色底物液 A（Substrate Solutions A）	10ml	2-8℃
显色底物液 B（Substrate Solutions B）	10ml	2-8℃
终止液（Stop Solution）	10ml	2-8℃
预包被酶标板（Pre-coated Immunoplate）	8×12 孔	2-8℃
外泌体标准品（Exosome Standards）	500µl	**-20℃**
生物素化检测抗体（Detection Antibody Biotin Conjugated）	25µl	2-8℃
HRP 标记的链霉亲和素（Streptavidin HRP Conjugated）	20µl	2-8℃
封板膜（Sealing Film）	5 张	RT

需准备的其它试剂和设备

1、去离子水和 1×PBS。

2、配试剂用的离心管、试管和量筒等。

3、移液器及枪头。

4、酶标仪和湿度培养箱（37℃）。

注意事项

1、**本试剂盒仅适用于科学研究，不能用于临床诊断**。

2、收到此试剂盒后，请将试剂盒成分**“外泌体标准品”**单独存放至-20℃冰箱中，避免反复冻融，其余试剂 2-8℃保存。

3、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℃)平衡 15-30 分钟后方可使用，酶标板被开封后如未用完，剩余板条通过铝箔袋自身拉链封闭，2-8℃保存，**需在一个月内用完。**

4、洗涤液为浓缩液（25×），使用时根据用量用蒸馏水或去离子水稀释成 1×工作液。如果浓缩洗涤液有结晶析出，稀释前需在水浴（37℃）中完全溶解，混匀后使用。所有试剂在使用前需要混匀。

5、在每次样本测定时要同步做标准曲线，如果待测物质含量过高（样本 OD 值大于外泌体标准品最高浓度孔的 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、用样本稀释液来稀释生物素化检测抗体（**1:500**）；用样本稀释液来稀释 HRP 标记的链霉亲和素（**1:1,000**）。

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、1xPBS 或无外泌体血清。

操作方法

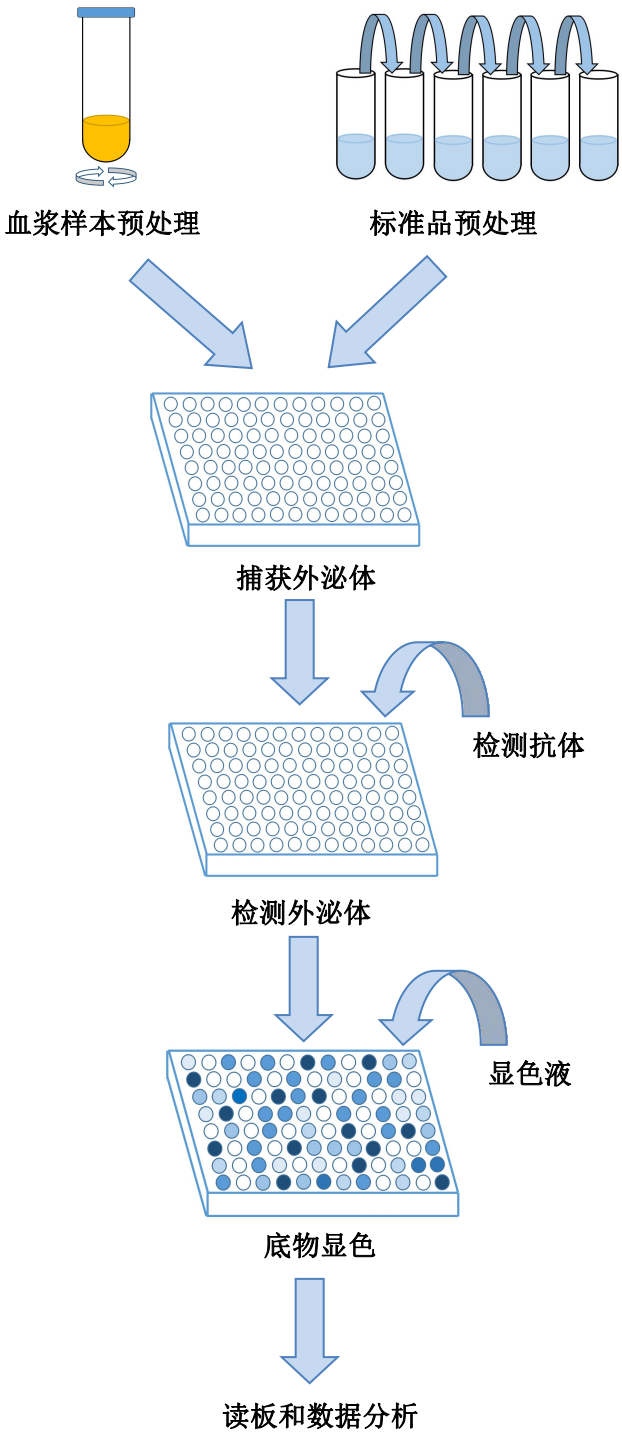

图 1　简单操作流程图

一、外泌体捕获

1、样本预处理

对于冻存血浆样品，室温或 25℃水浴解冻，待完全融化后置于冰上；对于新鲜全血样品，用无热原、无内毒素的试管或离心管采集血液标本，将试管或离心管室温放置 2 小时或 4℃过夜，待血清完全析出，转移血清至新管中，置于冰上，12,000×g，4℃离心 15min，去除细胞或细胞碎片，离心后将上清转移至新管中。

2、标准品预处理

取出标准品，室温或 25℃水浴解冻，待完全融化后置于冰上，标准品中外泌体浓度为 **3.0×10^10 个/ml**，将标准品在离心管（试剂盒不提供，应低吸附蛋白质）中按照表 1 所示依次用样本稀释液作倍比稀释，然后按照图 2 所示（红色为不同浓度的标准品，灰色为阴性对照）加样，100μl/孔，不同浓度标准品和阴性对照做复孔测定，测得的 OD 值取其平均值，绘制标准曲线。

表 1

A	标准品 1	200μl 标准品原液加入 200μl 样本稀释液，混匀
B	标准品 2	取出 200μl 标准品 1 加入 200μl 样本稀释液，混匀
C	标准品 3	取出 200μl 标准品 2 加入 200μl 样本稀释液，混匀
D	标准品 4	取出 200μl 标准品 3 加入 200μl 样本稀释液，混匀
E	标准品 5	取出 200μl 标准品 4 加入 200μl 样本稀释液，混匀
F	标准品 6	取出 200μl 标准品 5 加入 200μl 样本稀释液，混匀，取 200μl 弃掉
G	空白对照	200 μl 样本稀释液

注：稀释的标准品可于-20℃存放二周。

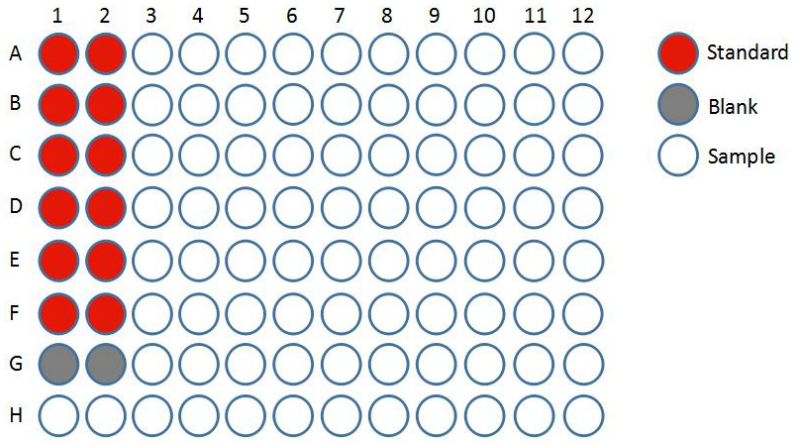

图 2 标准品稀释流程

3、捕获外泌体

标准品和检测样本处理后，分别加样 100μl/孔，封板，室温孵育 2h 或者 4℃孵育过夜。

注意：血浆不稀释，标准品按要求稀释。

二、外泌体定量

4、检测外泌体

弃去孵育的标准品和检测样本，在吸水纸上拍干，每孔加入 300μl 洗涤液（事先稀释为 1×）清洗 3 次，1min/次，弃去洗涤液后在吸水纸上拍干；然后加入 100μl/孔生物素标记的检测抗体（用样本稀释液稀释 500 倍），封板，室温孵育 1 个小时。弃去孵育的检测抗体，在吸水纸上拍干，每孔加入 300μl 洗涤液（事先稀释为 1×）清洗 3 次，1min/次，弃去洗涤液后在吸水纸上拍干，最后加入 100μl/孔链霉亲和素-过氧化物酶（用样本稀释液稀释 1000 倍），封板，室温孵育 30min。

5、底物显色

弃去孵育液体后在吸水纸上拍干，每孔加入 300μl 洗涤液（事先稀释为 1×）清洗 5 次，1min/次，彻底弃去液体后在吸水纸上拍干，每孔依次先后加入显色液 A 和显色液 B 各 50μl，不封板，轻轻混匀，室温条件下避光反应 5-10min，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，与捕获的外泌体数量呈正相关，即外泌体数量越多，颜色越深。

6、读板

适时（一般在 10min 内）加入终止液，50μl/孔，轻轻混匀，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，以标准品浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，用计算机软件进行回归拟合生成标准曲线，回归分析确定最佳拟合曲线。通过对浓度值和 OD 值取对数拟合，可以对标准曲线线性化处理，得到标准曲线方程 y=ax+b，将所测样本的吸光度值 y 值带入标准曲线方程后，可得到检测样品的浓度，即 x 值，**样品的 OD 值需落在标准曲线范围内**。根据样

品的 OD 值由标准曲线查出或算出相应的浓度。如果样品的 OD 值超出标准曲线范围内，需将样品稀释，重新测定，样品的实际浓度需乘以稀释倍数。

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。外泌体标准品浓度(NTA)：**3.0×10^10 个/ml**。

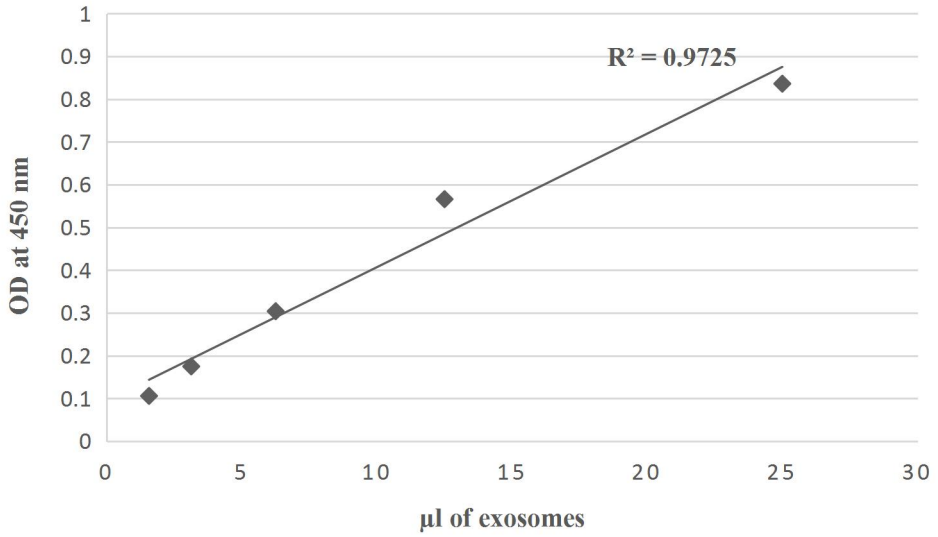

图 3 正常人血浆中外泌体标准曲线示例图

样本	O.D.450nm	100µl 样本中外泌体颗粒数
1	0.845	7.8×10^9 个/ml
2	0.959	9.1×10^9 个/ml
3	1.089	1.0×10^10 个/ml
4	1.396	1.36×10^10 个/ml
5	1.761	1.73×10^10 个/ml

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 值不小于 0.97。

2、灵敏度：最低检测浓度约 2.0×10^8 个/ml。

3、特异性：不与其它可溶性结构类似物交叉反应。

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

应用	相关产品	目录号
外泌体捕获和定量	总外泌体捕获和定量试剂盒（细胞培养上清）	RGEXOC100-1
外泌体捕获和定量	总外泌体捕获和定量试剂盒（人尿液）	RGEXOU100-1
外泌体捕获和定量	总外泌体提取和纯化试剂盒(人血清）	RGEXOS100-1
外泌体 DNA 分离	外泌体 DNA 分离试剂盒	EXODNA50C-1/ EXODNA30C-1
外泌体 RNA 分离	外泌体 RNA 分离试剂盒	EXORNA50C-1/ EXORNA30C-1

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℃保存，未使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：可能有以下原因产生：

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 37℃左右。

2.平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 平板进行清洗，不要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：可能有以下原因产生：

1.加样量多少不一，操作时间长短不一。重复同一样本时，加样量与加样时间应

保持相同，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：其它外泌体定量方法还有哪些？

A4：除了外泌体捕获和定量试剂盒（ELISA 法）外，电子显微镜（扫描电镜和透射电镜）法，是根据颗粒大小来区分外泌体和其它囊泡；Nanosigt 法，是根据颗粒的光散射，在光镜下计数颗粒（包括外泌体）数量和大小；QPCR 法，是根据外泌体内含物中稳定含有的小 RNA，如 snoRNA U6，noRNA U38B 和 noRNA U43 等。

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。

公司：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**