

EasySep™人细胞外囊泡 (CD9) 正选试剂盒

可处理 20 mL 生物液体样本

产品号 #17894

正选

文档号 #1000035742 | 版本00



Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

电话: 400 885 9050

E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM

产品介绍

通过免疫磁珠正选从血浆、血清、条件培养基和尿液中分离人CD9细胞外囊泡 (EVs)。

- 操作简单、快速
- 无需分离柱

该试剂盒使用识别特异性四跨膜蛋白标志物CD9的抗体来正选EVs。目的EVs用抗体和磁珠标记,并通过EasySep™磁极进行无柱分选。不需要的生物液体组分通过简单倾倒弃去,而所需的EVs则保留在试管中。最终分离的组分中含有高纯度的EV,可立即用于下游应用,例如DNA/RNA提取、western blot或质谱分析。

正选后不建议解离磁珠, EVs在解离磁珠后仍与抗体复合物结合。与EVs结合的抗体复合物和磁珠可能会与Billiant Violet™偶联抗体、聚乙二醇修饰蛋白或其他化学相关配体相互作用。

包含组分

| 组分名称 | 组分号# | 规格 | 储存方式 | 效期 | 成分 |
|---|--------|----------|--------------------|----------|-------------------|
| EasySep™人 CD9 正选抗体混合物 | 17894C | 1 x 1 mL | 2 - 8°C 储存。 勿冷冻 | 具体效期请见标签 | 保存在PBS中的单克隆抗体混合物。 |
| EasySep™ Releasable RapidSpheres™ 50201磁珠 | 50201 | 2 x 1 mL | 2 - 8°C 储存。 勿冷冻 | 具体效期请见标签 | 保存在水中的磁珠悬浮液。 |

PBS - 磷酸盐缓冲液

试剂盒组分可在室温 (15 - 25°C) 下运输, 但应按照上述说明进行储存。

样本制备

有关可用的冻存样本, 请参见 www.stemcell.com/primarycells。

血浆 (来自全血)

1. 将全血以 2000 x g 离心10分钟。吸取血浆层并转移至锥形管 (例如, 产品号 #38009/38010)。
2. 将步骤1得到的血浆层以 2000 x g 离心10分钟。吸取血浆上清液并转移至新的锥形管中。
3. 将血浆上清液以 10,000 x g 离心30分钟, 以去除细胞碎片和大囊泡。吸取血浆上清液并转移至所需的试管或孔板中 (参见表1 - 2)。
可选: 如需要, 可以在分选 EV 之前使用0.2 µm过滤器过滤血浆。

对于其他生物液体 (尿液除外), 请按照条件培养基的处理方法 (步骤 2 - 3) 去除细胞和大囊泡。

条件培养基

1. 收集条件培养基并转移至锥形管 (例如产品号 #38009/38010)。
2. 将条件培养基以 2000 x g 离心10分钟。吸取上清液并转移至新的锥形管中。
3. 将上清液以 10,000 x g 离心30分钟。吸取上清液并转移至所需的试管中 (参见表1 - 2)。
4. 可选: 如果使用稀释的样本, 请使用 30K 或 100K 离心过滤管 (例如, PALL 产品号 #MAP030C36/MAP100C36) 进行浓缩。
5. 可选: 如需要, 可以在分选EVs之前使用 0.2 µm 过滤器过滤上清液。

尿液

如果使用冻存的尿液, 请在样本处理之前完全解冻。

1. 涡旋尿液以得到均匀的悬液。
2. 将尿液在室温 (15 - 25°C) 下以 1000 x g 离心10分钟。吸取上清液并转移至新的试管中。

注: 对于新鲜尿液, 建议添加蛋白酶抑制剂以防止蛋白降解。

注: 如不立即使用, 请将尿液冷冻在 -20°C 以长期保存。

3. 可选（推荐）：将上清液在室温下以 10,000 x g 离心30分钟，以预纯化样本。注：此步骤可减少 THP 污染，但可能会降低最终的EV回收率。
4. 对于 ≤ 2 mL 的样本，吸取上清液并转移至所需的试管或孔板中（参见表 1 - 2），
或者
对于 $> 2 - 20$ mL 的样本，将尿液转移至100K离心过滤管以浓缩样本。在室温下，以 1000 x g 离心30分钟。收集滤膜上方浓缩的部分并转移至所需的试管中（参见表 1）。用推荐缓冲液定容至1 mL。



推荐缓冲液

D-PBS（不含Ca⁺⁺和Mg⁺⁺；产品号 #37350）

使用指南 – EasySep™ 手动实验流程

请参阅第1页和第2页了解样本制备和推荐缓冲液。有关每种磁极的详细使用方法，请参阅表1和表2。

表1. EasySep™ 人细胞外囊泡（CD9）正选试剂盒操作流程

| 步骤 | 说明 | EASYSEPTM 磁极 | |
|----|---|--|--|
| | |  EasySep™ (产品号 #18000) |  “The Big Easy” (产品号 #18001) |
| 1 | 将样本添加到所需的试管中。 | ≤ 0.5 - 2 mL | 1 - 8 mL |
| | 所需的试管。 | 5 mL (12 x 75 mm) 聚苯乙烯流式管 (如: 产品号 #38007) | 14 mL (17 x 95 mm) 聚苯乙烯流式管 (如: 产品号 #38008) |
| 2 | 在样本中加入分选抗体混合物。 注意: 不要滴旋抗体混合物。 | 如样本 ≥ 0.5 mL, 加入 50 μL/mL 注: 如样本 < 0.5 mL, 加入 25 μL 抗体混合物。 | 50 μL/mL 样本 |
| | 混匀并孵育。 | 室温孵育 10 分钟 或 对于浓缩的尿液样本, 室温孵育 30 分钟 | 室温孵育 10 分钟 或 对于浓缩的尿液样本, 室温孵育 30 分钟 |
| 3 | 涡旋 Releasable RapidSpheres™。 注意: 磁珠应呈均匀分散状态。 | 30 秒 | 30 秒 |
| 4 | 将 Releasable RapidSpheres™ 加到样本中。 | 如样本 ≥ 0.5 mL, 加入 100 μL/mL 注: 如样本 < 0.5 mL, 加入 50 μL 磁珠。 | 100 μL/mL 样本 |
| | 混匀并孵育。 | 室温孵育 10 分钟 或 对于浓缩的尿液样本, 室温孵育 30 分钟 | 室温孵育 10 分钟 或 对于浓缩的尿液样本, 室温孵育 30 分钟 |
| 5 | 添加推荐的缓冲液, 将样本定容至指定体积。 通过轻轻上下吹吸 2 - 3 次来混匀。 | 定容至 2.5 mL | <ul style="list-style-type: none"> ● 若样本 < 4 mL, 定容至 5 mL ● 若样本 ≥ 4 mL, 定容至 10 mL |
| | 将试管（不加盖）放入磁极中并孵育。 | 室温孵育 5 分钟 | 室温孵育 5 分钟 |
| 6 | 拿起磁极, 以一个连续的动作翻转磁极和试管*, 倾倒入上清液。 注意: 倾倒后请勿将试管从磁极中取出。直接进行后续分选步骤。 | 弃去上清液 | 弃去上清液 |
| 7 | 添加推荐的缓冲液, 将样本定容至指定体积。 通过轻轻上下吹吸 2 - 3 次来混匀。 | 定容至 2.5 mL | <ul style="list-style-type: none"> ● 若样本 < 4 mL, 定容至 5 mL ● 若样本 ≥ 4 mL, 定容至 10 mL |
| | 孵育。 | 室温孵育 1 分钟 | 室温孵育 1 分钟 |
| 8 | 拿起磁极, 以一个连续的动作翻转磁极和试管*, 倾倒入上清液。 注意: 倾倒后请勿将试管从磁极中取出。直接进行后续分选步骤。 | 弃去上清液 注: 如果起始样本是条件培养基, 请跳至步骤 10 | 弃去上清液 注: 如果起始样本是条件培养基, 请跳至步骤 10 |
| 9 | 重复以上步骤。 | 再重复两次步骤 7 和 8 (总共进行 1 次 5 分钟和 3 次 1 分钟的分选) | 再重复两次步骤 7 和 8 (总共进行 1 次 5 分钟和 3 次 1 分钟的分选) |
| 10 | 从磁极中取出试管。将 EVs 重悬于所需培养基中。 请确保从试管壁上收集 EVs。 | 分选后的 EVs 可立即用于下游应用 | 分选后的 EVs 可立即用于下游应用 |

RT - 室温 (15 - 25°C)

* 保持磁极和流式管倒置 2 - 3 秒, 然后恢复直立。不要摇晃或擦拭掉仍可能挂在管口的任何液滴。

表2.EasySep™人细胞外囊泡（CD9）正选试剂盒操作流程

| 步骤 | 说明 | EasyPlate™ (产品号 #18102) |  |
|----|---|--|---|
| 1 | 将样本添加到所需的96孔板中。 | 0.2 mL | |
| 2 | 在样本中加入分选抗体混合物。 注意：不要涡旋抗体混合物。 | 50 µL/mL 样本 注：如样本 < 0.2 mL，添加10 µL抗体混合物。 | |
| | 混匀并孵育。 | 室温孵育10分钟 或 对于浓缩的尿液样本，室温孵育30分钟 | |
| 3 | 涡旋振荡RapidSpheres™。 注意：磁珠应呈均匀分散状态。 | 30 秒 | |
| 4 | 将Releasable RapidSpheres™ 加到样本中。 | 100 µL/mL 样本 注：如样本 < 0.2 mL，加入20 µL RapidSpheres™ | |
| | 混匀并孵育。 | 室温孵育10分钟 或 对于浓缩的尿液样本，室温孵育30分钟 | |
| 5 | 添加推荐的缓冲液，将样本定容至指定体积。 通过轻轻上下吹吸2 - 3次来混匀。 | 定容至0.2 mL | |
| | 将孔板（不加盖）放入磁极中并孵育。 | 室温孵育5分钟 | |
| 6 | 小心地吸取（切勿倾倒）上清液。 注意：请勿将孔板从磁极中取出。直接进行后续分选步骤。 | 弃去上清液 | |
| 7 | 添加推荐的缓冲液，将样本定容至指定体积。 通过轻轻上下吹吸2 - 3次来混匀。 | 定容至0.2 mL | |
| | 孵育。 | 室温孵育1分钟 | |
| 8 | 小心地吸取（切勿倾倒）上清液。 注意：请勿将孔板从磁极中取出。直接进行后续分选步骤。 | 弃去上清液 注：如果起始样本是条件培养基，请跳至步骤10。 | |
| 9 | 重复以上步骤。 | 再重复两次步骤7和8 (总共进行1次5分钟和3次1分钟的分选) | |
| 10 | 从磁极中取出孔板。将EVs重悬于所需培养基中。 | 分选后的EVs可立即用于下游应用 | |

RT - 室温（15 - 25°C）

注意事项和提示

若要通过western blot免疫染色评估CD9四跨膜蛋白标志物，请使用以下酶或荧光染料偶联的抗体克隆：

- 抗人CD9抗体，克隆HI9A (产品号 #100 - 0138)

有关更多信息，请访问www.stemcell.com查看实验方法：如何通过Western Blotting鉴定细胞外囊泡。

生物液体样本间差异

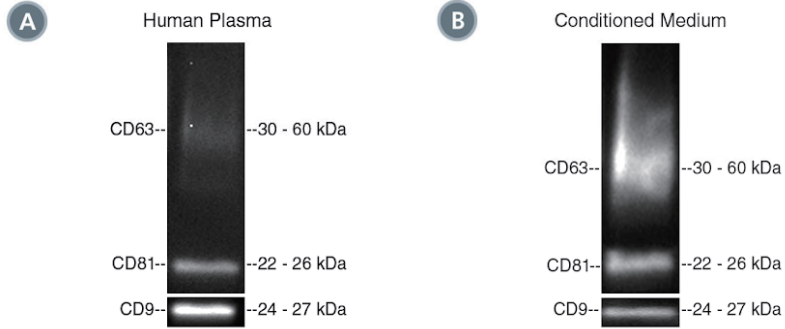
不同生物液体样本（包括相同类型的不同样本和不同类型样本）中EVs上表达的四跨膜蛋白类型和表达量可能不同。这可能会影响后续四跨膜蛋白的得率与数据分析。

优化回收率

如需提高EV回收率，请使用以下方法之一：

- 将分选抗体混合物的孵育时间增加至30分钟，和/或
- 加入双倍的分选抗体混合物和RapidSpheres™
注：两个组分的用量必须同时增加。
- 对于 < 2 mL 的样本，建议使用EasySep™ 磁极（产品号 #18000）。

实验数据



上述示例采用western blot分析了从（A）人血浆和（B）条件培养基中通过正选分离出表达CD9四跨膜蛋白标志物的EVs。

产品仅供研究使用。除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。若想了解更多关于产品质量和合规的信息，请访问WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANC。

版权所有© STEMCELL Technologies Inc. 2025。保留一切权利，包括图形和图像。STEMCELL Technologies及其设计及徽标，以及Scientists Helping Scientists、EasySep、EasyPlate和RapidSpheres均是STEMCELL Technologies Canada Inc.的商标。所有商标均为各自所有者所有。STEMCELL尽力确保STEMCELL及其供应商提供的信息正确无误，对此类信息的准确性或完整性不作任何保证或声明。