

→ 樣品微過濾 → 外吐小體超過濾收集



MERCK Exosome 外吐小體



研毅企業有限公司
ANTEC Bioscience Inc

www.antec-bio.com.tw

Exosome

外吐小體

Exosome (外吐小體) 是一種直徑約 30~100 nm 的小囊泡，幾乎所有的動物細胞都會分泌，這些外吐小體會將被膜包覆著的蛋白質和遺傳物質釋放到如血液、尿液、唾液、淚液、脊髓液、羊水等體液中。外吐小體內部由 mRNA、miRNA、lipids 及 protein 等物質所組成，並會隨著分泌細胞的來源及狀態而有所改變。

外吐小體可通過細胞膜受體直接活化體細胞，也可運輸蛋白質、mRNA、miRNA、lncRNA 及 circRNA 進入體細胞，參予細胞間的連繫溝通；外吐小體在免疫、發炎反應、血管生成、凋亡、凝血過程中扮演重要的角色。近年來，更被發現癌細胞分泌的外吐小體和癌症的轉移有很大的關係，它不只可作為多種疾病的早期診斷標誌，也能作為藥物進行癌症治療。

外吐小體在細胞內形成，細胞膜向內 "出芽" 突出形成小泡，之後包裹在單層膜 (MVB) 中的多個小囊泡 (ILV)，MVB 與細胞膜融合並將外吐小體釋放到細胞外。

細胞外的外吐小體主要通過下列三種方式作用於標的細胞

1. 內吞

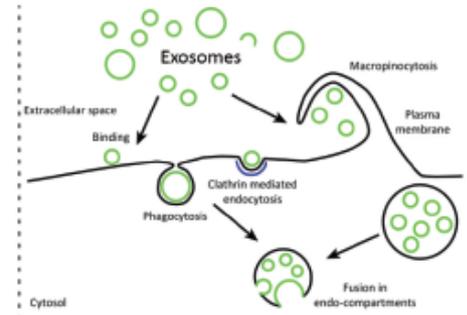
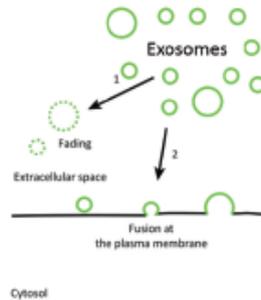
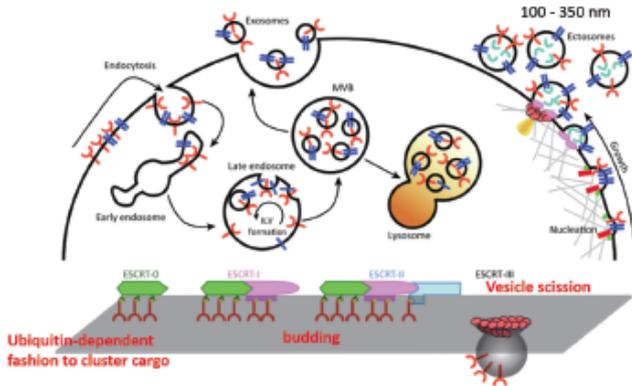
標的細胞通過內吞或是吞噬作用將外吐小體包進標的細胞內。

2. 與細胞膜融合

在酸性條件下，外吐小體與細胞膜融合，直接將內容物釋放到標的細胞中。

3. 特異性

外吐小體表面 ligand 和標的細胞膜表面特異性受體結合後，將外吐小體運送到標的細胞中。



樣品收集，微過濾去除細胞碎片



Millex® 針筒過濾器
(適合 1-20mL 樣品)

細胞生長至匯合

PBS 洗 3 次後細胞
繼續飢餓培養 24-48h

細胞繼續在有血清環境中培養

收集細胞培養上清

離心 / 抽濾去除細胞及細胞碎片 (300g, 10min)

0.22um 過濾去除囊泡等大顆粒物質



Stericup 濾杯
(適合 100-1000mL 樣品)

超過濾製備外吐小體

無血清樣品

<50mL 50-200mL >200mL

Amicon Ultra
-3 KDa 超濾管

Centricon Plus70
-3 KDa 超濾管

Amicon Stirred Cell
3 KDa 超膜片

Amicon® Ultra-3kDa 超濾管進一步濃縮



Centricon
Plus70

含血清樣品

<50mL 50-200mL >200mL

Amicon Ultra
100 KDa 超濾管

Centricon Plus70
100 KDa 超濾管

Amicon Stirred Cell
100 KDa 超膜片

Amicon® Ultra-3kDa 超濾管進一步濃縮



Amicon®
Stirred Cell



Amicon®
Ultra
超濾管

外吐小體用於細胞學或動物實驗前的無菌處理

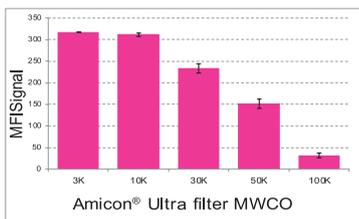
(此步驟為選做)

經過上述方法製備的外吐小體在進行細胞或動物實驗之前還需進一步除菌過濾，使樣品達到無菌的狀態，建議採用離心方式處理，以減少過濾時的外吐小體樣品流失。

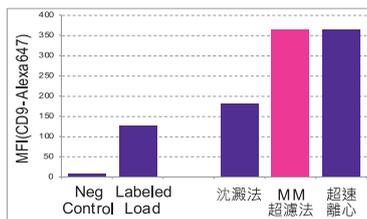


Ultrafree 離心式微濾管

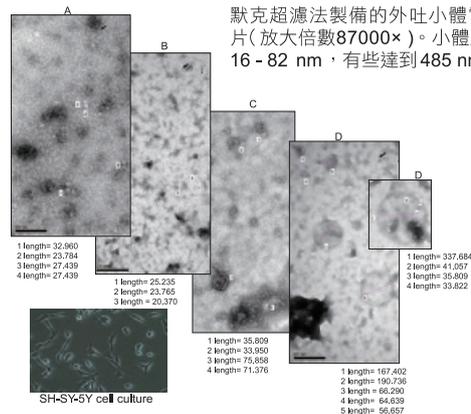
不同截留分子量的超濾管
外吐小體製備產量比較



不同方法製備外吐小體產量比較



默克超濾法製備的外吐小體電顯照片(放大倍數87000×)。小體直徑約16-82 nm，有些達到485 nm。



貼心小提醒

- 無血清樣品選擇 3 kDa，提高外吐小體回收率。
- 有血清樣品選擇 100 kDa 可去除細胞分泌蛋白及血清成份中白蛋白所造成的影響。
- 可依據樣品的黏稠度及標的外吐小體大小分佈，選擇適合的孔徑 (3 kDa/10 kDa/30 kDa/50 kDa/100 kDa)，以達到最佳回收率。
- 如需進一步提高特定外吐小體的純度，可選用 anti-CD63 抗體 (#CBL553) 進行 IP，將其純化出來。
(300µg 樣品 + 5µg CD63 Antibody + Protein A/G Beads (#LSKMAGAG02))

樣品微過濾

首先須要決定過濾的方式，是使用針頭過濾或者是使用抽氣過濾的方式。一般取決於樣品的體積來決定。

小體積區：Syringe filters（針頭加壓過濾方式）1~20ml

珍貴的樣品或者是樣品量較少時，可依據樣品體積大小來選擇適合過濾的膜。

Product	材質	Cat No.	Description	Qty/Pk
	PES	SLGP033RS	Millex-GP 0.22µm PES 33mm	50
		SLGP033RB	Millex-GP 0.22µm PES 33mm	250
	PVDF	SLGV033RS	Millex-GV 0.22µm PVDF 33mm Gamma Sterilized	50
		SLGV033RB	Millex-GV 0.22µm PVDF 33mm Gamma Sterilized	250

中體積區：Steriflip（抽真空過濾方式）20~50ml

將樣品裝在 50ml 離心管中，50 ml 離心管可以直接旋轉在 Steritop 裝置上，以抽氣過濾的方式過濾，可快速又安全的達到過濾的效果。

Product	材質	Cat No.	Description	Qty/Pk
	PES	SCGP00525	Steriflip-GP 50mL Express Plus PES .22µm RS	25
	PVDF	SE1M179M6	Steriflip-GV, 0.22 µm, PVDF, radio-sterilized	25

Animal free

大體積區：Stericup（抽氣過濾方式）100ml ~ 1000ml

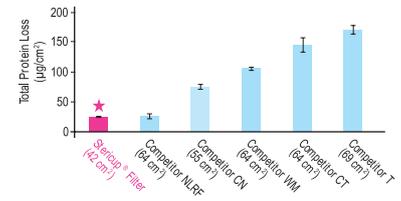
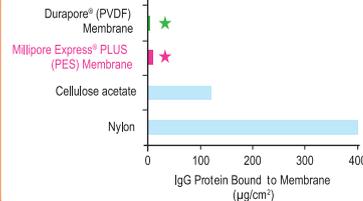
樣品體積大，可以選擇抽氣過濾的方式，能較快達到過濾的效果。

Product	Cat No.	Funnel Capacity (ml)	Receiver Bottle (ml)	Qty/Pk
Stericup-GP 0.22 um 	SCGPU01RE	150	150	12
	SCGPU02RE	250	250	12
	SCGPU05RE	500	500	12
	SCGPU10RE	500	1000	12
	SCGPU11RE	1000	1000	12

Product	Cat No.	Funnel Capacity (ml)	Receiver Bottle (ml)	Qty/Pk
Steritop-GP 0.22 um 	SCGPS01RE	150	33 mm	12
	SCGPT01RE		45 mm	12
	SCGPS02RE	250	33 mm	12
	SCGPT02RE		45 mm	12
	SCGPS05RE	500	33 mm	12
	SCGPT05RE		45 mm	12
	SCGPS10RE	1000	33 mm	12
	SCGPT10RE		45 mm	12

貼心小提醒

- 建議選用 PES (Polyethersulfone) 及 PVDF (Polyvinylidene Fluoride)，兩者皆為低蛋白質殘留的產品，以確保樣品有最低的殘留量。殘留量最低的為 PVDF 材質。
- 血清樣品為了操作者安全，建議使用 Steriflip 來過濾，避免操作者接觸血液。



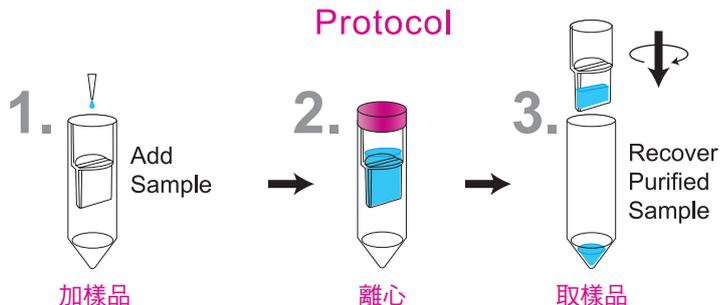
外吐小體超過濾收集

依照樣品體積來選擇適合的超濾裝置。

小體積區：Amicon Ultra（離心超濾方式）0.5ml~15ml

- 使用 RC (Regenerated Cellulose) 材質，蛋白質殘留量少。
- Dead volume stop 設計：就算離心時間過久，也不用擔心樣品離到乾掉。並可計算最終的樣品稀釋倍數。
- Heat sealing：不用擔心黏膠的膠體溶劑溶出，對 sample 產生影響。
- 回收率高：採用 TFF 方式濃縮，樣品不易堆疊，回收率高。
- 快速：使用濃縮離心管形式，不只可以濃縮還可以進行置換 buffer 的動作。
- 安全：離心管為 PP 材質，不易破碎。

步驟 1.2.3
拿到 Sample 好簡單



Amicon® Ultra Centrifugal Filters

	Product	Amicon® Ultra-0.5	Amicon® Ultra-2	Amicon® Ultra-4	Amicon® Ultra-15
	Maximum initial sample volume (mL)	0.5	2	4	15
	Final concentrate (retentate) volume (µL)	15–20	15–70	30–70	150–300
MWCO	Qty/Pk				
3,000 MWCO	8	UFC500308		UFC800308	UFC900308
	24	UFC500324	UFC200324	UFC800324	UFC900324
	96	UFC500396		UFC800396	UFC900396
	500	UFC5003BK			
10,000 MWCO	8	UFC501008		UFC801008	UFC901008
	24	UFC501024	UFC201024	UFC801024	UFC901024
	96	UFC501096		UFC801096	UFC901096
	500	UFC5010BK			
30,000 MWCO	8	UFC503008		UFC803008	UFC903008
	24	UFC503024	UFC203024	UFC803024	UFC903024
	96	UFC503096		UFC803096	UFC903096
	500	UFC5030BK			
50,000 MWCO	8	UFC505008		UFC805008	UFC905008
	24	UFC505024	UFC205024	UFC805024	UFC905024
	96	UFC505096		UFC805096	UFC905096
	500	UFC5050BK			
100,000 MWCO	8	UFC510008		UFC810008	UFC910008
	24	UFC510024	UFC210024	UFC810024	UFC910024
	96	UFC510096		UFC810096	UFC910096
	500	UFC5100BK			



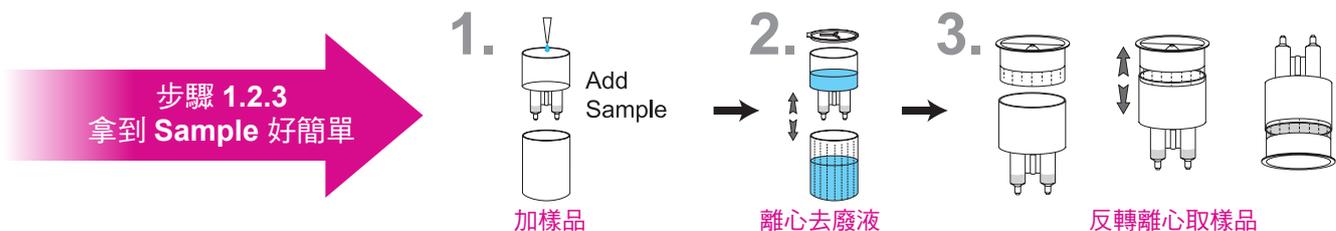
外吐小體收集超過濾

依照樣品體積來選擇適合的超濾裝置。

中體積區：Centricon Plus 70 (離心超濾方式) 15ml ~ 70ml

- 回收率高：使用 RC (Regenerated Cellulose) 材質，蛋白質殘留量少。
- Heat sealing：不用擔心黏膠的膠體溶劑溶出，對 sample 產生影響。
- 經濟：可重覆使用。
- 快速：使用濃縮離心管形式，不只可以濃縮還可以進行置換 buffer 的動作。
- 安全：PP 材質，不易破碎。

Protocol



Product	Cat No.	Description	MW (kDa)	Qty/Pk
	UFC700308	Centricon Plus-70 Centrifugal Filter, Ultracel-PL Membrane	3	8
	UFC710008	Centricon Plus-70 Centrifugal Filter, Ultracel-PL Membrane	100	8

大體積區：Stirred cell（氮氣加壓超濾方式） 50ml ~ 400ml

- 快速：可選配連續式裝置，超濾大量樣品。
- 經濟：超濾膜可重覆使用。
- 過濾和超濾可在一樣的裝置進行。
- 內含有 Stir bar，讓樣品可均勻的接觸超濾膜，達到超濾的效果。
- 方便：可以輕易的從外觀看出超濾的進度。

Product	Cat No.	Description	Membrane Diameter (mm)	MW (KDa)	
				3	100
	UFSC05001	Amicon® Stirred Cell 50mL	44.5	PLBC04310	PLHK04310
	UFSC20001	Amicon® Stirred Cell 200mL	63.5	PLBC06210	PLHK06210
	UFSC40001	Amicon® Stirred Cell 400mL	76	PLBC07610	PLHK07610

氣體產生器 MINI N2 日本原裝

Online
純度偵測

超經濟
免換鋼瓶

免排水

美化
環境

體積小

超靜音



	氮氣產生機		氧氣產生機	
Model	Micro Mini 2N (3N) (4N)		Micro Mini O2	
Outlet Pressure	0.3MPa		0.3MPa	
Flow Rate	99%	4.0 NL/min	90%	1.0 NL/min
	99.9%	2.0 NL/min		
	99.99%	1.0 NL/min		
Dimensions	280(W)x380(D)x360(H)			
Weight	20kg			
Noise	50dB(A)			
Electrical Requirement	AC100V 50/60Hz			
Power Consumption	180W			