

HUMSC 外泌体说明书

Cat#CTE-052

一、详情

HUMSC 外泌体是由脐带间充质干细胞（Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell, HUMSC），经 3D 培养获得上清液通过切向流过滤（Tangential Flow Filtration, TFF）分离获得的外泌体颗粒。

二、用途

各类疾病模型的组织修复或治疗相关的功能机制研究。

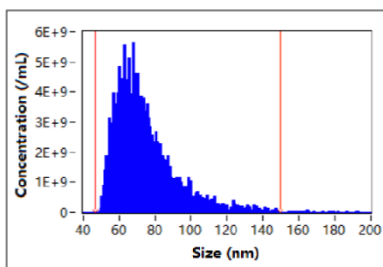
三、参数

编号	参数项	参数结果
1	外观	透明液体
2	pH	6.8-7.4
3	无菌检测	无菌生长
4	颗粒浓度	$\geq 2E+11$ Particles/ml (NanoFCM)
5	颗粒粒径分布	30-150 nm (NanoFCM)
6	总蛋白浓度	/ (BCA)
7	形态检测	清晰的囊泡结构 (TEM)
8	外泌体蛋白标志物	3 阳 1 阴 (WB)
9	外泌体抗炎活性检测	抑制炎症相关基因的表达
10	外泌体促修复活性	促进成纤维细胞的迁移

四、保存

内容	冻存状态
形式	液体
保存	$\leq -65^{\circ}\text{C}$
使用建议	冰上解冻，使用前震荡混匀
保存时间	一年
注意事项	避免反复冻融，因外泌体的固有属性，其颗粒数会随着保存时间的延长而下降，请尽快使用

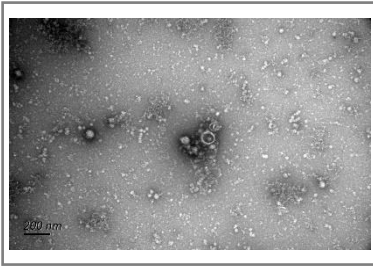
五、图片



通过 NanoFCM 检测外泌体的粒径分布和颗粒浓度。

提前准备好浓度标准品、粒径标准品、空白对照和样品，按照使用说明，对纳米流式仪进行液流初始化和管路气泡排除。首先用超纯水将浓度/粒径分布标准品稀释合理倍数，按照纳米流式仪操作规程进行纳米流式仪的质控，将纳米流式仪调试到最佳检测状态后（散射和荧光通道的信号均达到最强且均一），采用浓度标准品，校准仪器的浓度测试状态，采用粒径分布标准品，校准仪器的粒径分布的测试状态；按照仪器操作说明，依次用超纯水和洗液清洗进样毛细管。在纳米流式仪 LabelledExo 样品测量模式下检测复合缓冲液的颗粒数用于空白对照，复合缓冲液作为后续样品的稀释溶剂，在使用前需用 0.22 微米滤膜过滤。外泌体样品用复合缓冲液预稀释合适的倍数，在纳米流式仪中进行样品数据采集，测定样本的颗粒浓度及粒径分布。



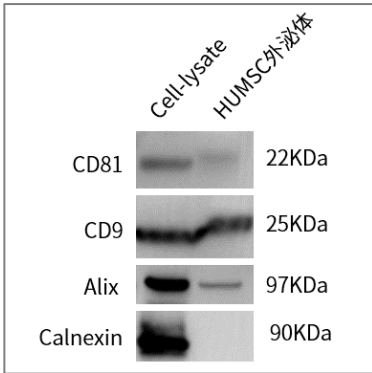


HUMSC 外泌体的 TEM 表征

透射电子显微镜观察法 (TEM) 是在高倍放大下直接观察单个外泌体的形态结构和大小。对外泌体的形态和大小进行鉴定, 通过透射电子显微镜可以看到外泌体呈现清晰的囊泡结构。

电镜制样: PBS 和负染液分别经膜过滤和离心前处理; 外泌体浓度控制在 300ng/μl, 用负染液进行负染后置于铜网上; 吸干铜网上的液体后在电镜拍照检测。

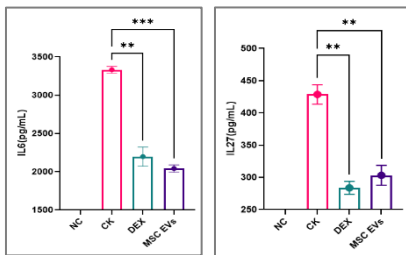
检测仪器: Hitachi 日立 H-7650 透射电子显微镜



HUMSC 外泌体的 WB 表征

通过 Western Blot 方法检测外泌体三阳一阴标志物的表达。

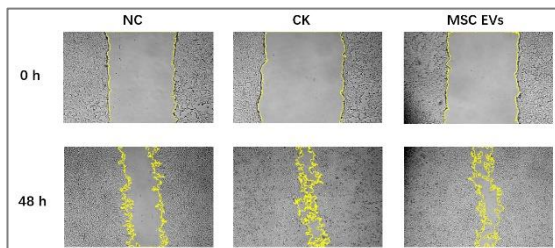
细胞裂解液作为阳性对照。首先裂解细胞, RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 (100×) 混合比例为 100:1。采用 BCA 方法测定总蛋白浓度。细胞裂解蛋白和外泌体分别加 5×Loading Buffer (4:1), 后沸水浴煮蛋白至变性, 制胶, 或直接购买预制胶, 等蛋白上样量约为 20μg, 电泳, 先 80 V 后 120 V, 根据目标蛋白的分子大小确定适宜的电泳时间, 电泳分离后进行转膜, 封闭 1 h, 孵育一抗和二抗, 然后 TBST 溶液清洗, 最后化学发光显色 (化学发光 A/B 液=1:1)。



HUMSC外泌体对IL-6 (左)、IL-27 (右) 基因表达的影响

干细胞外泌体的抗炎活性检测。

RAW264.7细胞以 1.5E+05 cells/孔铺于24孔板, 贴壁过夜。NC为未诱导细胞。其他组均加入100 ng/mL LPS用于构建炎症模型, 阴性对照组CK仅加入LPS, 阳性对照组额外加入10 μM Dexacortol (DEX), 外泌体处理组额外加入2E+10 Particles/mL MSC EVs, 共培养24 h。收集细胞上清, 1000 g 离心5 min, 取上清-80 °C保存。ELISA检测炎症相关细胞因子IL-6、IL-27分泌情况。



HUMSC外泌体的促修复活性检测

干细胞外泌体的促修复活性检测。

小鼠胚胎成纤维细胞3T3以4 E+05 cells/孔铺于12孔板, 过夜培养。2%FBS低血清培养基预处理3h, 枪头竖直划下3条划痕(左中右各一条)。划痕后, PBS洗三次, 阴性对照组 (NC) 为未处理细胞, 对照组 (CK) 加入5 ng/mL TGF-β, 外泌体组 (MSC EVs) 加入2E+10 Particles/mL MSC EVs。0h、48h进行拍照。

