

ExoLoad[®]核酸负载试剂盒说明书

Cat#ELSR-06-01, 规格 1E+11*2T

一、详情

外泌体是细胞主动分泌到胞外的用于细胞间通讯的天然载体，由于其具有免疫源性低、穿透性高、可工程化修饰、能装载核酸和蛋白等不同类型药物等诸多优势，被评为新一代药物递送平台。工程化外泌体正在成为小核酸分子的重要载体。为了实现基于外泌体的小核酸递送目的，现有内源表达、电穿孔和化学转染为主的外源装载等不同的技术路线。

恩泽康泰开发的 ExoLoad[®]试剂盒是通过定制开发针对外泌体的专属转运肽 ETP(EV-Transit Peptide)将 siRNA、microRNA、ASO 等小核酸高效导入外泌体中，可方便快捷实现外泌体小核酸的高效装载，用于小核酸递送的功能研究以及药物治疗研究。

二、组分

组分	1E+11*2T	保存条件	运输条件	保质期
外泌体转运肽 EV-Transit Peptide	150μl	4°C	冰袋运输	一年
siRNA 阳性对照 siRNA Positive Control	100μl/300pmol	-20°C		
反应液 Reaction Buffer	250μl	常温		
清洗液 Wash Buffer	20ml	常温		

三、注意事项

1. 避免反复冻融。由于多肽的固有属性，会随保存时间延长而效率降低，溶解后请尽快使用
2. 若后续有无菌要求请在无菌环境中操作。试用装不赠送超滤管，正式装所赠为非无菌超滤管（无商业化无菌超滤管），建议超滤产物进行后续实验时，添加抗生素或进一步过滤除菌，超滤管室温保存即可
3. 若采用荧光定量法进行定量，在负载、检测全程和保存等过程中请注意避光

四、操作步骤

1. 外泌体准备:

通过 SEC+UC 等方式分离纯化外泌体,或直接从恩泽康泰购买纯化好的高纯度外泌体货架产品(外泌体浓度建议高于 1E+11 particles/ml)

2. 试剂配制及保存:

试用装中 ETP 和 siRNA 均为溶液状态，正装为干粉。ETP 和 siRNA 溶液请分别于 4°C和-20°C保存。

3. 核酸包载:

按照以下顺序与用量加入试剂:

1. 小核酸	2. 外泌体	3. ETP	4. 反应液
300 pmol	1E+11 particles	60 μl	加入外泌体体积的 1/10

37°C避光孵育 2h (请勿自行延长孵育时间), 期间 150rpm 持续震荡。

siRNA 阳性对照为带 FAM 荧光的 siRNA，负载进外泌体后可通过酶标仪（激发光 488nm，发射光 515nm-535nm）快速检测负载量，作为实验过程阳性对照（非必须）。建议阳性对照负载体系为

1. siRNA 阳性对照	2. 外泌体	3. ETP	4. 反应液
100 pmol (33.3μl)	3.3E+10 particles	20 μl	加入外泌体体积的 1/10



4. 去除游离小核酸:

将孵育后的样本转移至 100kD 超滤管 (建议使用 Millipore, UFC8100 超滤管), Wash Buffer 补齐至 4ml, 4000×g 离心约 20-30min 至体积约 100μl (外泌体来源、浓度、纯度等不同会导致离心时间有较大差别, 第一次离心过程中注意观察体积: 可以不加清洗液, 先离心 30s, 若液面已经低于两侧滤膜, 说明外泌体浓度过低或滤膜破损, 会导致外泌体大量损失)。

再次加 Wash Buffer 至 4ml 进行第二次清洗, 4000×g 离心至目的体积, 如 200μl。

反复轻柔吹打滤膜上的外泌体后, 转移至空 EP 管中, 便获得负载的外泌体。

可选步骤: 浓缩至 200μl 后继续浓缩至 100 μl, 反复轻柔吹打超滤管滤膜后转移至 EP 管中, 再加入 100μl 清洗液轻柔吹打超滤管滤膜数十次, 转移至同一 EP 管中, 混匀, 以增加外泌体超滤回收率。

注: 负载后的外泌体请 12 小时内用于下游实验。根据外泌体纯度不同, 超滤回收率约为 30%。

五、常见问题与解决方案

1. 如何对负载的外泌体进行小核酸定量?

1) 荧光定量法: 合成带荧光的核酸完成负载, 随后通过荧光强度进行定量。注意避光操作。

以包载 Cy3-ASO 为例, 用 PBS 对 Cy3-ASO 进行系列稀释: 1μM、500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.3nM、15.6nM、7.8nM、3.9nM、2.0nM、1.0nM、0nM 各 100μl。负载后的外泌体混匀, 取 3μl 用 PBS 稀释 40 倍至 120μl。稀释后的 Cy3-ASO、负载后的外泌体样品各取 80ul 加入黑色 96 孔板孔板中, 用酶标仪测定荧光值, 梯度稀释的 Cy3-ASO 制作荧光值-浓度标准曲线, 并根据负载后的外泌体样品荧光值计算出装载后的 ASO 总量。同时通过 BCA 或 NanoFCM 对外泌体的质量或颗粒数进行定量, 便可获得最终的外泌体载量。载量计算公式:

$$X = (A * B * C) / D$$

式中:

X——单位外泌体中负载的 ASO 量

A——样品荧光值带入标曲计算得到的 ASO 浓度

B——样品荧光检测时的稀释倍数

C——负载后的外泌体样品总体积

D——BCA 或 NanoFCM 测得的 ExoLoad® 装载后的外泌体总量

注: 带入单位换算

2) qPCR 定量法: 若包载的 siRNA/miRNA 无荧光标记, 则需要通过 qPCR 的方法进行定量。负载分子用 RNase Free-H₂O 进行梯度稀释 100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM、0.001nM 各 100μl, 用于 CT 值-浓度标准曲线制作。负载后的外泌体进行 RNA 提取, 同梯度稀释的待负载小核酸分别进行反转录和 qPCR 检测。具体检测方法参考实验室所使用的反转录和 qPCR 检测相关试剂盒, 引物设计可以参考生工 https://www.sangon.com/class_mirna_stemloop.html。载量计算公式:

$$X = (A * B) * (C / D) / E$$

式中:

X——单位外泌体中负载的小核酸量

A——样品 CT 值带入标曲计算得到的小核酸浓度

B——外泌体提取 RNA 后的 RNA 体积

C——负载后的外泌体总体积

D——负载后的外泌体用于 RNA 提取的体积

E——BCA 或 NanoFCM 测得的 ExoLoad® 装载后的外泌体总量

注: 带入单位换算; 若过程中涉及稀释需乘以稀释倍数

2. ExoLoad® 对外泌体的尺寸等特征是否有影响?

ExoLoad® 对外泌体的形貌、尺寸和标志蛋白均不会产生影响



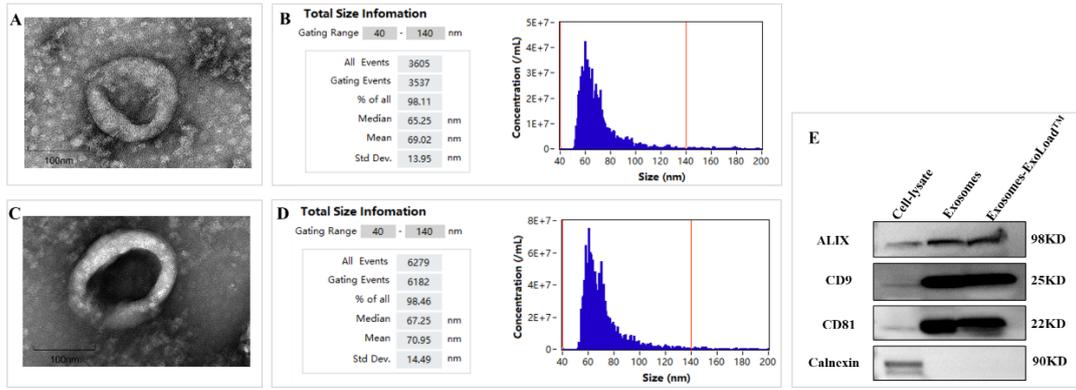


图 1. A-B, 负载前的外泌体 TEM 形貌和 NanoFCM 粒径分布; C-D, ExoLoad® 负载后的外泌体 TEM 形貌和 NanoFCM 粒径分布; E, ExoLoad® 负载前后外泌体的三阳一阴标志蛋白表达

3. ExoLoad® 对各类核酸的装载量如何?

ExoLoad® 可有效装载 ASO、miRNA、siRNA 等不同类型小核酸, 载量媲美电穿孔



图 2. ExoLoad 和电穿孔分别装载 ASO (左)、siRNA (中) 和 miRNA (右) 的载量

4. ExoLoad® 负载后的外泌体对受体细胞调控效率如何

1) ExoLoad® 负载后的外泌体具有极高的核酸递送效率

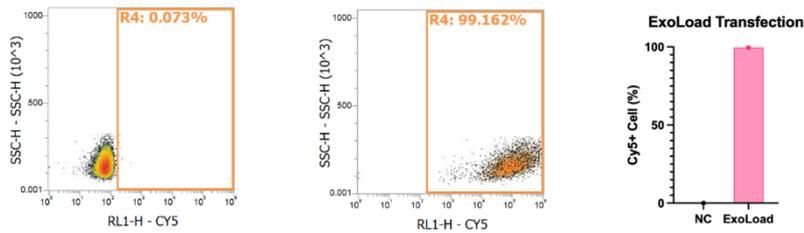


图 4. 空白对照 (左) 和 ExoLoad® (中) 负载 Cy5-ASO 的外泌体细胞共孵育流式结果, 流式结果统计柱状图 (右)

2) ExoLoad® 负载后的外泌体可有效调控受体细胞的靶基因表达

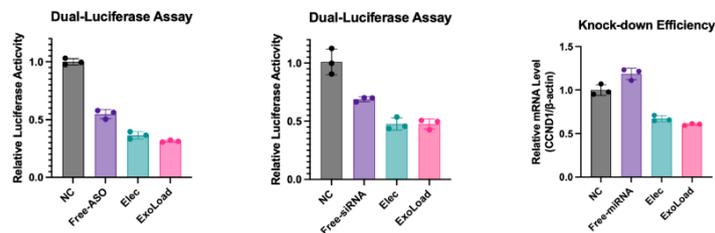


图 5. ExoLoad® 分别负载 ASO (左)、siRNA (中)、miRNA (右) 后的外泌体对受体细胞靶基因沉默效果

5. ExoLoad® 的安全性如何

基于相同原理的方法已用于临床试验。在我们的测试中, ExoLoad® 负载的外泌体对细胞未展示出毒副作用



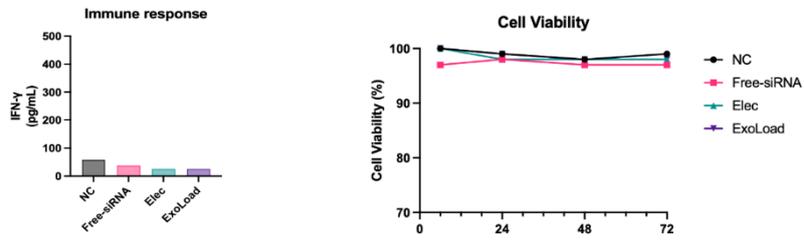


图 6. ExoLoad[®]负载 siRNA 后的外泌体细胞共孵育的细胞因子（左）和细胞活性（右）检测结果

