

BeyoExo™外泌体标记与示踪试剂盒(PKH67)

产品编号	产品名称	包装
C3635S	BeyoExo™外泌体标记与示踪试剂盒(PKH67)	50次
C3635M	BeyoExo™外泌体标记与示踪试剂盒(PKH67)	250次

产品简介:

- 碧云天研发生产的BeyoExo™外泌体标记与示踪试剂盒(PKH67) (BeyoExo™ Exosome Labeling and Tracking Kit with PKH67), 也称外泌体标记试剂盒(Exosome Labeling Kit)或外泌体染色试剂盒(Exosome Staining Kit), 是一种以PKH67为荧光探针快速灵敏地标记外泌体, 以用于外泌体示踪研究的试剂盒。本试剂盒可用于研究外泌体的靶向、吞噬和运输机制等, 可使用荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光酶标仪、流式细胞仪等荧光检测系统进行检测。
- 外泌体(Exosome)是膜包裹的细胞外囊泡(Extracellular vesicles, EVs), 直径约为40-160nm, 具有脂质双分子层结构, 天然存在于血液、尿液、脑脊液, 以及体外培养细胞的上清液中[1], 几乎所有类型的细胞都可以产生并释放外泌体[2]。细胞膜内吞(Endocytosis)依次形成初级内体(Early sorting endosome, ESE)、次级内体(Late sorting endosome, LSE)和多囊泡体(Multivesicular body, MVB), 其中多囊泡体包含腔内囊泡(Intraluminal vesicles, ILVs)。多囊泡体与细胞膜融合形成外泌体, 外泌体携带多种来自其母体细胞的成分(包括核酸、蛋白质、脂类和代谢物等)释放到胞外基质中[3]。外泌体可以被附近或远距离的细胞识别和融合, 是细胞间进行相互调控的重要媒介, 参与了癌症、神经退行性病变和炎症性疾病等多种疾病的发病过程, 影响细胞多方面的功能[4-5]。
- PKH67是一种新型的可用于外泌体标记和示踪的荧光探针, 与PKH1和PKH2相比, 其结构上带有更长的脂肪族碳尾(Carbon tails), 能稳定插入细胞膜、外泌体膜等的脂质区域。PKH67荧光背景低, 脂溶性高, 可以通过与外泌体膜的脂质分子结合而标记外泌体。PKH67呈绿色荧光, 最大激发波长为490nm, 最大发射波长是502nm, 与荧光素(Fluorescein)的荧光检测兼容。PKH67还可以用于细胞体外标记、体外细胞增殖研究以及长期的体内外细胞示踪研究。PKH67在体内的荧光半衰期为10-12天, 因此PKH67非常适合用于示踪研究, 也适用于细胞毒性实验, 可与碘化丙啶(Propidium iodide, PI) (ST511/ST512)或7-氨基放线菌素D (7-Aminoactinomycin D, 7-AAD) (C1053/ST515)等细胞活力荧光探针联合使用, 或者与橙、红色荧光探针例如藻红蛋白、红色荧光蛋白(如RFP、mCherry等)等结合使用[6-7]。碧云天同时提供BeyoExo™外泌体标记与示踪试剂盒(PKH26) (C3637), PKH26为红色荧光。
- 本试剂盒提供专用于PKH67稀释的Diluent C, 标记效果更好;同时, 本试剂盒提供了荧光标记终止液, 可以终止剩余的游离PKH67染料的标记作用, 因此无须对标记后的外泌体再进行纯化就可以避免残留染料后续进入待研究的细胞而造成假阳性。本试剂盒用于外泌体标记后, 示踪标记后的外泌体进入L929细胞(小鼠成纤维细胞)的效果如图1所示。

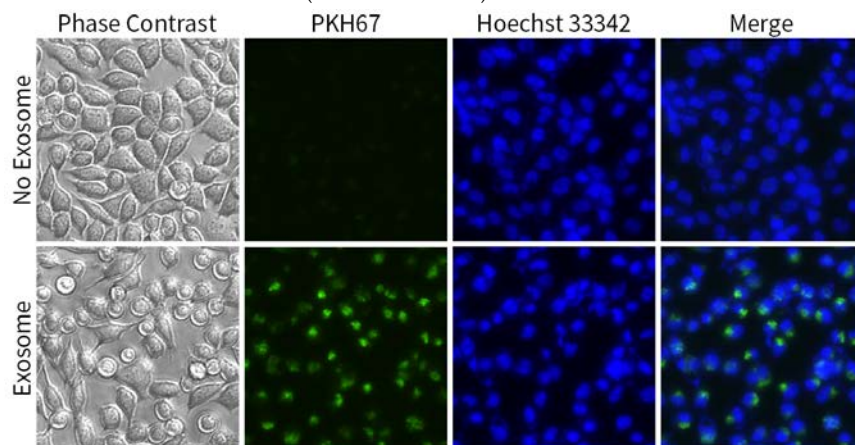


图1. 碧云天BeyoExo™外泌体标记与示踪试剂盒(PKH67) (C3635)标记外泌体后示踪其进入L929细胞(小鼠成纤维细胞)的效果图。BeyoExo™ HEK293细胞外泌体(High Purity) (C3801)组或无外泌体组, 都经过PKH67标记和终止标记的实验步骤后, 与L929细胞共同孵育24小时并洗涤2次后进行荧光显微镜下检测。无外泌体组(No Exosome), 几乎观察不到绿色荧光, 说明PKH67染料被终止得比较完全; 而与外泌体共培养的L929细胞中(Exosome), 可以观察到绿色标记的外泌体进入细胞, 并且相应的绿色荧光和细胞膜并不重叠, 提示外泌体并没有和细胞膜均匀融合。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- 对于6孔板, 按照每孔需100μl PKH67标记工作液标记10μg外泌体进行计算, 本试剂盒的小包装和中包装分别可以进行50次和250次外泌体的标记和细胞的标记与示踪。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
C3635S-1	PKH67 (250X)	20 μ l
C3635S-2	Diluent C	200 μ l
C3635S-3	荧光标记终止液	10ml
C3635S-4	Hoechst 33342 (1000X)	20 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
C3635M-1	PKH67 (250X)	100 μ l
C3635M-2	Diluent C	1ml
C3635M-3	荧光标记终止液	50ml
C3635M-4	Hoechst 33342 (1000X)	100 μ l
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 一年有效。其中PKH67 (250X)和Hoechst 33342 (1000X)须避光保存。

注意事项:

- PKH67 (250X)易水解并且易挥发, 第一次使用时请分装成小包装后-20°C保存, 以避免反复冻融并减少挥发。PKH67 (250X)每次取用时, 请注意尽量减少开盖的时间, 尽量即开即用, 用后立即盖紧盖子。如果因为未及时盖紧盖子导致液体的挥发, 后续使用时可以先测量体积, 并按照有效浓度相应增加进行计算和使用。
- PKH67 (250X)在-20°C、4°C等较低温度情况下会凝固而粘在离心管管底、管壁或管盖内, 可在室温或37°C水浴片刻至全部融解后, 使用BeyoFuge™掌上离心机(5000rpm) (E6686)快速离心3-5秒, 使附着在管盖或管壁上的PKH67 (250X)聚集于管底。
- 含血清、BSA或BSA类似物的溶液对本PKH67的标记有干扰, 须避免。
- 荧光染料均存在淬灭问题, 请尽量注意避光, 以减缓荧光淬灭。
- 荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板, 推荐使用碧云天BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装) (FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装) (FCP965)。
- PKH67 (250X)有易燃性, 操作时请小心, 并注意有效防护, 同时必须远离热源、花火、明火、热表面等可能引起燃烧的环境; 对人体有害或有刺激性, 操作时请小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 外泌体的定量。

取适量外泌体进行蛋白浓度测定, 推荐碧云天的BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0009/P0010/P0010S/P0011/P0012/P0012S)、Bradford蛋白浓度测定试剂盒(去垢剂兼容型) (P0006C)。

2. PKH67标记工作液的配制。

- PKH67标记工作液的用量。对于6孔板, 每孔的PKH67标记工作液约100 μ l, 其它培养器皿的用量以此类推。
- PKH67标记工作液的配制。取适量PKH67 (250X), 先用Diluent C将PKH67 (250X)进行10倍稀释, 混匀后为PKH67 (25X), 再用合适的溶液(须不含血清或BSA, 如无血清培养液、HBSS或PBS)将PKH67 (25X)进行25倍稀释, 混匀后即**为PKH67标记工作液(1X)**。例如: 5 μ l PKH67 (250X)中加入45 μ l Diluent C, 即为50 μ l的PKH67 (25X); 进一步加入1.2ml无血清培养液, 混匀后即**为PKH67标记工作液(1X)**。

注1: 因为KH67易水解, 所以无论是25X还是1X, 须现配现用, 不能提前配制, 并且配制时须注意避光, 否则会影响标记效果。

注2: PKH67标记工作液中PKH67的最终浓度需根据不同外泌体、外泌体颗粒数、纯度、体积、装载的细胞和实验体系通过预实验进行优化。PKH67的推荐工作浓度为1X, 可以在0.5X-5X范围内摸索最佳工作浓度。

注3: 须按照推荐配制方法进行PKH67标记工作液的配制, 请勿将PKH67 (250X)直接添加到外泌体样品中进行标记, 但可尝试将PKH67 (25X)直接加入外泌体样品中进行标记, 最终浓度为1X左右即可。

3. 外泌体的标记和终止(以10 μ g外泌体的标记为例)。

- 外泌体的标记。按照每100 μ l PKH67标记工作液可以标记约10 μ g外泌体的比例, 在外泌体样品中加入PKH67标记工作液, 混匀后室温避光孵育1-5分钟。此时体积约为100-110 μ l。外泌体的体积通常不宜超过10 μ l。

注1: 为了保证结果的重复性和准确性, 应使用高纯度的外泌体和PKH67标记工作液进行孵育, 以减少外泌体溶液的体积, 建议外泌体浓度为1mg/ml以上, 浓度过低可能会影响标记效果。外泌体蛋白浓度偏低时, 可以在配制PKH67标记工作液时, 减少稀释倍数, 即提高PKH67标记工作液的浓度, 例如可以提高至1.2-5X。推荐使用碧云天的BeyoExo™ HEK293细胞外泌体(High Purity) (C3801)或BeyoExo™牛奶外泌体(High Purity) (C3805)作为阳性对照。如果需要提取外泌体, 推荐碧云天的BeyoExo™增强型细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法) (C3622)。

注2: 由于PKH67标记工作液的染色速度很快, 外泌体加入后孵育1-5分钟即可, 通常不能超过10分钟。标记时间过长可能会导致外泌体膜完整性丧失。

注3: 可根据实际情况适当调整外泌体和PKH67的浓度, 避免在很小(<100 μ l)或很大(>5ml)的体积下进行外泌体的标记。

- b. 标记后的终止。孵育结束后, 加入与PKH67标记工作液等体积的荧光标记终止液, 混匀后室温避光孵育1分钟, 以终止剩余的游离染料。此时体积约为200-220 μ l。

注1: 标记后的终止很重要, 以避免未标记的游离PKH67染料后续直接染色细胞。建议空白设置对照以确定终止效果(参考图1)。

注2: 本荧光标记终止液可能对某些外泌体标记后的终止效果较弱甚至无终止效果, 此时可使用外泌体提取或纯化的方法再次提取外泌体以去除未标记的游离PKH67染料, 或者使用3-10kDa的超滤管(FUF049/FUF050/FUF051/FUF149/FUF150/FUF151)进行超滤处理。再次提取或超滤处理可能会损失一部分外泌体。

4. 标记外泌体的细胞装载和示踪(以装载6孔板的一个孔细胞为例)。

a. 对于悬浮细胞。

(a) 细胞按照实验设计进行一定处理后, 酌情取约10-100万细胞600 \times g室温离心5分钟, 弃上清。将PKH67标记并终止后的外泌体(约200-220 μ l)与新鲜的含血清的完全培养液(约1.8ml)按1:9的体积进行混合, 然后用该混合溶液(共约2ml)重悬细胞, 并加入至6孔板中。

(b) 细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育1-24小时, 不同的细胞最佳孵育时间不同。以1小时作为初始孵育时间, 根据实际所用的细胞对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。

(c) 37 $^{\circ}$ C孵育结束后, 600 \times g 4 $^{\circ}$ C离心3-4分钟, 沉淀细胞。弃上清, 注意尽量不要吸除细胞。

(d) 用PBS洗涤2次。每次加入1ml PBS重悬细胞, 600 \times g 4 $^{\circ}$ C离心3-4分钟, 弃上清。

(e) 如果需要对细胞核进行染色, 可以参照步骤5进行。如无其它的特殊需要, 再用适量PBS重悬细胞后, 用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜对外泌体标记和示踪的细胞进行观察, 也可以用荧光分光光度计检测或流式细胞仪分析。

b. 对于贴壁细胞。

(a) 吸除培养液, 根据具体实验如有必要可以用PBS或其它适当溶液洗涤细胞一次。如下以6孔板的一个孔为例进行说明, 如果使用其它的多孔板, 各种试剂的用量需要相应按比例调整。

(b) 将PKH67标记并终止后的外泌体(约200-220 μ l)与新鲜的含血清完全培养液(约1.8ml)按1:9的体积进行混合, 然后加入至细胞培养孔中。

(c) 细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育1-24小时, 不同的细胞最佳孵育时间不同。以1小时作为初始孵育时间, 根据实际所用的细胞对孵育时间进行适当优化以得到最佳的效果。

(d) 37 $^{\circ}$ C孵育结束后, 吸除上清, 用PBS洗涤2次。

(e) 如果需要对细胞核进行染色, 可以参照步骤5进行。如无其它的特殊需要, 再加入2ml PBS, 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下对外泌体标记并示踪的细胞进行观察。如果考虑使用荧光酶标仪检测, 优先推荐使用碧云天的BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)(FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)(FCP965), 分别进行顶读或底读模式进行荧光检测。

注: 对于贴壁细胞, 如果希望采用流式细胞仪检测, 可以先消化并收集细胞, 重悬后参考悬浮细胞的检测方法。

5. 细胞核染色(选做)。

注: 为了检测外泌体进入细胞的装载情况或方便观察每个细胞, 可以考虑使用Hoechst 33342进行细胞核染色。

a. 1X Hoechst 33342溶液的配制: 按1:1000比例用PBS稀释本试剂盒提供的Hoechst 33342 (1000X), 例如取1 μ l Hoechst 33342 (1000X)加入1ml PBS中, 混匀, 即得1ml 1X Hoechst 33342溶液。

b. 按步骤4a (e)或4b (e), 每孔加1X Hoechst 33342溶液1ml, 室温避光孵育10分钟。

c. 吸除1X Hoechst 33342溶液, 用PBS洗涤2次(悬浮细胞需离心)。

d. 随后即可进行荧光检测。Hoechst 33342为蓝色荧光, 最大激发波长为346nm, 最大发射波长为460nm。

6. PKH67检测的参数设置。

使用490nm激发波长, 502nm发射波长, 实时、逐时间点或单时间点检测刺激前后荧光的强弱。PKH67标记后的外泌体的荧光光谱和Fluorescein非常相似, 可以用检测Fluorescein或者FITC的参数设置进行检测。

参考文献:

1. Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, Clevers HC. J Biol Chem. 1991. 15; 266(5): 3239-45.
2. Luo W, Dai Y, Chen Z, Yue X, Andrade-Powell KC, Chang J. Commun Biol. 2020. 10; 3 (1): 114.
3. Kalluri R, LeBleu VS. Science. 2020. 367 (6478).
4. He C, Zheng S, Luo Y, Wang B. Theranostics. 2018. 1; 8 (1): 237-255.
5. Zhang Y, Bi J, Huang J, Tang Y, Du S, Li P. Int J Nanomedicine. 2020. 22; 15: 6917-6934.
6. Horan PK, Melnicoff MJ, Jensen BD, Slezak SE. Methods Cell Biol. 1990. 33:469-90.
7. Teare GF, Horan PK, Slezak SE, Smith C, Hay JB. Cell Immunol. 1991. 134(1):157-70.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
AF0601-50 μ l	BeyoExo™ HSP70 Rabbit mAb (Exosome Validated)	50 μ l
AF0605-50 μ l	BeyoExo™ CD63 Rabbit mAb (Exosome Validated)	50 μ l

AF0608-50μl	BeyoExo™ TSG101 Rabbit mAb (Exosome Validated)	50μl
AF0611-50μl	BeyoExo™ CD9 Rabbit mAb (Exosome Validated)	50μl
C0922	BeyoExo™通用型外泌体专用培养液	50/500ml
C3620	细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法)	50/250次
C3622	BeyoExo™增强型细胞上清外泌体提取试剂盒(沉淀法)	50/250次
C3625	BeyoExo™外泌体提取增强剂	1/5ml
C3629	BeyoExo™血清血浆外泌体提取试剂盒(沉淀法)	50/250次
C3632	BeyoExo™外泌体专用裂解液	20/100ml
C3801-100μg	BeyoExo™ HEK293细胞外泌体(High Purity)	100μg
C3803-100μg	BeyoExo™ HEK293细胞外泌体(High Purity, EGFP标记)	100μg
C3805	BeyoExo™牛奶外泌体(High Purity)	10mg/10mg× 10/10mg×100
S1971	BeyoExo™外泌体抑制剂(GW4869)	5mM×0.2ml/5mg /25mg
C3635	BeyoExo™外泌体标记与示踪试剂盒(PKH67)	50/250次
C3637	BeyoExo™外泌体标记与示踪试剂盒(PKH26)	50/250次

Version 2024.10.29