APPLICATION NOTE No. 476

使用一次性生物反应器和高速、超速离心机，快速、高效地从干细胞中分离外泌体

Pascal Rowart[1], Vincent Dufey[1], Jan Knop[2], Françoise De Longueville[1]
[1] Eppendorf Application Technologies S.A., Namur, Belgium
[2] Eppendorf SE, Hamburg, Germany
Corresponding author: rowart.p@eppendorf-eat.be
Additional contact: bioprocess-experts@eppendorf.com

摘要

细胞会在细胞外环境中释放不同类型的膜源性囊泡。这些膜源性囊泡被称为胞外囊泡（EV），包括外泌体和微泡体。外泌体是相对较小的胞外囊泡（30-150nm），可在细胞之间转移核酸、蛋白质、酶和脂质等生物大分子，是细胞间通讯的重要模式。此外，它们可以用作各种疾病的生物标志物，也可以作为下一代治疗剂的天然药物递送载体系统。
在本文中，我们描述了一种通过结合高速和超速离心机从脂肪源性干细胞中快速、简单地分离外泌体的方法。细胞在 BioBLU® 0.3c 一次性生物反应罐中培养，并由 DASbox® 迷你生物反应器系统控制。DASbox 迷你生物反应器系统可以培养大量干细胞，从而获得高产量的外泌体。随后，我们使用 CR22N 离心机对条件培养基进行了清除。这是一台高速离心机，RCF 高达 32,300 x g。在本文，我们使用了可同时容纳 10 x 50 mL 和 10 x 15 mL 锥底管的 R15A 固定角转。为了进一步浓缩外泌体，我们使用了最大 RCF 为 803,000 x g 的 CP100NX 超速离心机以及能够容纳 6 x 40 mL 离心管的 P32ST 水平转子。此外，相比于不使用蔗糖垫液的对照组，通过在超速离心步骤中使用蔗糖垫液，可以快速分离出纯净均一的外泌体。在整个离心过程中，我们都使用了大容量转子，从而减少了重复的离心步骤，并将外泌体分离时间缩短到 4 小时以内，快于沉淀或过滤等其他分离方法。

引言

细胞信号或细胞通讯是指细胞从其环境中接收、处理和传输信号的能力。这是组织正常发育和发挥功能的必要过程 [1]。细胞间通讯是通过直接的细胞相互作用或可溶性因子的分泌来实现的。大多数真核细胞会释放膜源性囊泡，也称为胞外囊泡（EV），可以对邻近和远处的细胞产生影响 [2-4]。





图 1：在这项研究中，我们通过结合 Eppendorf 生物工艺和离心机解决方案，建立了一套完整的外泌体生产和分离工作流程。DASbox 迷你生物反应器系统来自 Eppendorf 生物工艺控制器产品线，专为小规模平行生物反应器操作而设计。此外，CR22N 高速离心机和 CP100NX 超速离心机拥有全面的转子产品组合，可提供高达 6L 的超大容量和高达 803,000 x g 的相对离心力。

如需了解有关 DASbox 迷你生物反应器系统和 Eppendorf 离心解决方案的更多信息，请访问
https://www.eppendorf.com/dasbox/
https://www.eppendorf.com/exosomes/

在生理和病理条件下，许多细胞类型，如血细胞、树突细胞、内皮和上皮细胞、神经细胞、肿瘤细胞以及胚胎和成人干细胞，都会在细胞外空间释放大小为 30-1000nm 的胞外囊泡（EV）[5]。胞外囊泡还存在于体液中，如血清、唾液、羊水、滑液、母乳和尿液 [6,7]。胞外囊泡是由脂质双层膜和亲水性蛋白质包围的球形胞质溶胶片段，类似于细胞质膜，由各种生物活性分子组成，包括 RNA、DNA、蛋白质、mRNA、MicroRNA 和脂质 [7,8]。

胞外囊泡是异质性囊泡的集合，包括外泌体（30-150 nm）和微泡体（MV，150-1000 nm）[4,7,9]。外泌体来源于多泡体（MVB），通过内体膜的向内出芽形成后聚集。与之相反，微泡体是通过质膜直接向外出芽形成的 [10]。外泌体的形成于 1983 年首次被描述为 “ 反向内吞作用 ”。由于来源于胞内体，外泌体富含晚期胞内体成分，如 CD63、CD9 和 CD81 [11,12]。近年来，人们发现外泌体与免疫反应 [13]、中枢神经系统相关疾病 [14]、肿瘤发生和癌症 [15,16]、病毒传播 [17] 和神经系统疾病 [18] 有关。由于此种相关性，人们广泛研究了外泌体在诊断中作为生物标志物的作用 [19,20] 以及在各种病理治疗中的作用 [21]。

但外泌体研究领域仍然存在许多挑战，其中包括产量低下以及缺乏有效的生物制造平台。因此，我们需要采用成熟的细胞培养方法（已有 Application Note 介绍过如何使用 BioBLU 一次性生物反应罐进行细胞培养）[22-24]。此外，研究应用的差异以及来自周围蛋白质、脂蛋白和核酸的污染可能产生假阳性结果等等，可能导致不同研究团队的实验结果之间出现差异 [25]。



图 2：使用 DASbox 迷你生物反应器控制系统 (A) 在带有单斜叶搅拌桨的 BioBLU 0.3c 一次性生物反应罐 (B) 中培养可产生外泌体的人源脂肪干细胞(hADSC)。通过 DASware® control 软件监控生长参数。在以下离心机上完成分离过程：配备 R15A 固定角转的 CR22N 高速离心机 (C)，该转子能够同时容纳 10 x 50 mL 和 10 x 15 mL 锥底管；配备 P32ST 水平转子的 CP100NX 超速离心机 (D)，该转子能够容纳 6 x 40 mL 离心管。

随着人们对外泌体研究应用的兴趣与日俱增，可再现的纯化方法变得愈发重要。其中，最常见的五种纯化方法为：离心、色谱、超滤、沉淀和免疫亲和捕获 [26-32]。现如今，离心纯化已经成为业内的黄金标准 [33,34]。

在本应用说明中，我们首先使用配备 BioBLU 0.3c 一次性罐体的 DASbox 迷你生物反应器系统，利用微载体悬浮培养人源脂肪干细胞(hADSC)，然后使用 CR22N 高速离心机和 CP100NX 超速离心机完成外泌体分离(图 2)。这套工作流程能够提高活细胞产量，并且产生大量且高质量的外泌体(图 3)。

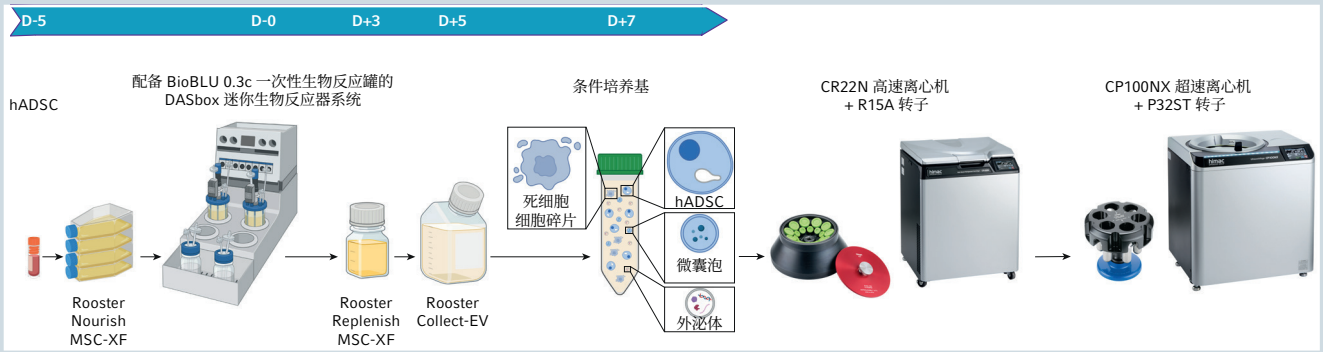


图 3：配备 BioBLU 0.3c 一次性生物反应罐的 DASbox 迷你生物反应器系统中细胞扩增和外泌体生产示意图，以及使用配备 R15A 固定角转的 CR22N 高速离心机和配备 P32ST 转子的 CP100NX 超速离心机进行外泌体分离的示意图。
* 使用 BioRender.com 绘制

材料与方法

在 BioBLU 0.3c 一次性生物反应罐中利用微载体培养人源脂肪干细胞 hADSC

使用 RoosterNourish-MSC-XF 培养基(RoosterBio®, KT-016), 在 T75 BioCoat® I 型胶原包被培养瓶(Corning®, 10175430)中扩增第 3 代(P3)人源脂肪干细胞(hADSC, Lonza, PT-5006)。5 天后, 使用 0.025% 胰蛋白酶 -EDTA (Lonza, CC-5012)和胰蛋白酶中和溶液(Lonza, CC-5002)处理细胞。使用 Vi CELL XR 自动细胞计数仪(Beckman Coulter®, 731050)对细胞进行计数。使用 DASbox 迷你生物反应器系统, 将总量为 6 x 10^6 的 hADSC 与 3.4 g Synthemax® II 低密度微载体(Corning, CLS3781)在 250 mL RoosterNourish MSC-XF 培养基中进行悬浮培养。该系统配备了两台 BioBLU 0.3c 一次性生物反应罐。为了促使细胞粘附到磁珠上, 在最初的 4 小时内不搅拌细胞和微载体。随后, 将搅拌速度设置为 80 rpm。细胞在 37°C 下培养, 溶氧(DO)水平设定为 40%。通过在罐体顶部自动添加 CO_2 和 NaOH(1M), 将生长培养基保持在 pH 7.2。

在第 3 天, 向悬浮液中加入 5mL RoosterReplenish-MSC-XF (RoosterBio, SU-023), 为细胞提供额外的生长因子。在培养的第 5 天, 将每台 BioBLU 0.3c 一次性生物反应罐转移到超净工作台下, 丢弃培养基, 使用 100 mL 磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤磁珠, 并加入 250 mL RoosterCollect-EV 培养基(RoosterBio, M2001)。然后, 将 BioBLU 0.3c 一次性生物反应罐放回 DASbox 迷你生物反应器系统培养 48 小时(胞外囊泡收集阶段)。通过用荧光分子 Invitrogen Calcein AM(Thermo Fisher Scientific®, C3099)对细胞进行染色, 在不同时间点评估细胞增殖情况, 并使用 Thermo Scientific Invitrogen Evos FL Auto 2 显微镜(Thermo FisherScientific, AMAFD2000)进行观察。在第 7 天, 收集条件培养基(CCM), 用于随后的离心步骤。使用 Vi-CELL XR 自动细胞计数仪对细胞进行计数。

通过高速和超速离心分离外泌体

为了从培养上清液中分离外泌体, 首先收集条件培养基并将其放入 50TC(50mL)和 15TC(15mL)离心管, 并在 4°C 下以 500 x g 离心 10 分钟。然后, 将上清液转移到新的离心管中, 并在 4°C 下以 2000 x g 再次离心 10 分钟。最后, 将上清液再次转移到新的离心管中, 并在 4°C 下以 20000 x g 离心 20 分钟。取一小份等分的上清液冻于 -80°C, 以供将来分析。到目前为止, 所有离心步骤均在配备 R15A 固定角转的 CR22N 高速离心机上完成。

接下来, 直接进行超速离心或使用 30% 蔗糖垫进行离心, 以便比较不同离心方法对外泌体纯度和完整性的影响 [35]。这些离心步骤在配备 P32ST 水平转子的 CP100NX 超速离心机上完成。对于蔗糖垫液超速离心法, 使用 27 号针头和注射器缓慢地将条件培养基转移到 40PET 离心管中, 并置于 4mL 30% 蔗糖溶液之上。对于直接超速离心法, 将条件培养基直接转移到 40PET 离心管中。使用 PET 离心管的原因是这种材料透明度高, 可在离心后看到沉降物。接下来, 将离心管在 4°C 下以 100,000 x g 离心 90 分钟。丢弃上清液, 同时在离心管底部保留 4 mL。为了再次配平离心管, 在顶部缓慢加入额外的条件培养基或 PBS 溶液(取决于条件培养基的初始体积), 然后在 4°C 下以 100,000 x g 再次离心 90 分钟, 浓缩外泌体并收集沉降物。在不破坏沉降物的同时, 尽可能多地丢弃上清液。将可能含有外泌体的沉降物重悬于 600µL PBS 溶液中, 每 200 µL 等分一份, 冻存于 -80℃。非条件培养基(RoosterCollect-EV 培养基)作为阴性对照。

粒度分布分析

通过动态光散射法(DLS)确定胞外囊泡的粒度分布状况。测量工作由 University of Namur 的平台和药学系完成。在 DLS 中, 通过配备λ=633nm 波长激光的 Zetasizer Ultra 纳米粒度仪(Malvern Panalytical, ZSU5700)测量胞外囊泡的粒度分布(PSD)。使用 Zetasizer Low Volume Disposable Sizing Cell 试剂盒(Malvern Panalytical, ZSU1002)在透明比色皿中分析外泌体沉降物。选择脂质体作为参考模型(折射率: 1.45, 粘度: 1.2PI, 温度: 20°C), 因为它与外泌体具有一些共同的物理特征, 如组成、大小和密度 [36]。结果显示, 这些颗粒为球形, 密度为 1.2 mg/mL, 折射率和吸收系数分别为 1.45 和 0.001。

电子显微镜

测量工作由 University of Liege 的 GIGA Neurosciences Laboratory for Cell and Tissue Biology 实验室完成。简而言之, 将外泌体悬浮液装载在透射电子显微镜(TEM)网格上, 并培养 1 小时。外泌体用过滤的 2.5% 乙酸铀酰溶液染色 10 分钟, 用注射器将该溶液添加到 TEM 网格的表面。使用滤纸从网格中去除多余的乙酸铀酰溶液。用水快速清洗网格, 以去除多余的染色溶液。使用 80kV 的 Jeol 透射电子显微镜(Jeol, JEM-1400)来分析外泌体的形态。

通过 CD63 ELISA 试剂盒定量外泌体

按照说明，使用 ExoELISA- ULTRA Complete Kit CD63 Detection 试剂盒（System Biosciences, EXEL-ULTRA-CD63-1）定量外泌体。简而言之，将每种样品的 50µL 放入 96 孔板中，并在 37°C 下培养 1 小时。使用 Eppendorf ThermoMixer® C，将孔板洗涤三次，每次 5 分钟。将 CD63 一抗在封闭液（1:100）中稀释。然后，向每个孔中加入 50 µL 抗体溶液，并在室温下振荡培养 1 小时。丢弃一抗，然后洗涤三次，每次 5 分钟。在封闭液（1:5000）中稀释二抗，向每个孔中加入 50 µL 抗体溶液，并在室温下振荡孵育 1 小时。在完成最后三道洗涤步骤后，将孔板与 50 µL TMB（3,3',5,5'- 四甲基联苯胺）ELISA 底物在室温下培养 15 分钟。加入相同量的终止缓冲液，并立即使用 xMark 微孔板分光光度计（Bio-Rad Laboratories, 1681150）在 450nm 下检测孔板，以提供测定的固定终点。

结果与讨论

人源脂肪干细胞 hADSC 在 BioBLU 0.3c 一次性生物反应罐中的增殖和培养

首先，将人源脂肪干细胞 hADSC 在 T75 培养瓶中初始扩增 5 天（图 4, D-2/D-0），以确保达到 85-90% 的融合度。然后，对细胞进行胰蛋白酶消化（5.3 x 10^5 cells/mL，活力：96.7%），并以 3.7 个细胞 / 磁珠的比率接种在低浓度 Synthemax® II 微载体（Corning）上。在 BioBLU 0.3c 一次性生物反应罐中扩增 1 天，钙黄绿素染色后的显微镜图像显示细胞成功附着在磁珠上（图 4, D+1）。第 6 天，观察到细胞增殖和微载体上的均匀分布（图 4, D+6）。在罐体中培养 5 天后，接下来两天将 RoosterNourish-MSC-XF 培养基换成 250mLRoosterCollect -EV 培养基，开始收集胞外囊泡（EV）。这种低颗粒的培养基用于生物工艺规模的纯净胞外囊泡收集，尤其适用于人间充质干细胞（hMSCs）。培养期结束时（D+7），细胞活力达到 97%，细胞密度为 1.96 x 10^6 cells/mL。通过 DASbox 迷你生物反应器系统对温度、pH 和 DO 水平等各种培养参数进行密切监控，使得培养系统能够在整个过程中标准化生产大量活细胞。这对于在细胞培养过程中获得可重复的外泌体数量和质量至关重要。

使用连续离心步骤从条件培养基中分离外泌体

将两台 BioBLU 0.3c 一次性生物反应罐（500mL）中的培养基合并用于以下步骤。然后，将培养基重新分配到 15TC 和 50TC 锥底管中。

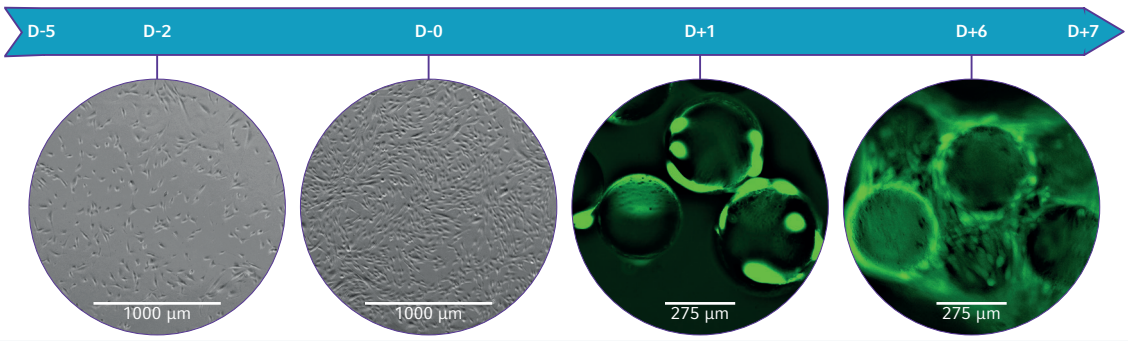


图 4：使用配有 BioBLU 0.3c 一次性生物反应罐(D-0 至 D+7)的 DASbox 迷你生物反应器系统在 T75 培养瓶(D-5 至 D-0)和磁珠上进行细胞培养。通过钙黄绿素染色，跟踪磁珠上的细胞生长。

随后，使用带 R15A 固定角转的 CR22N 高速离心机完成三道离心步骤(图 5A)。这三道离心步骤用于去除活细胞和磁珠(500 x g)、细胞碎片、死细胞、凋亡小体(2000 x g)和微泡体(20000 x g)。在完成每道离心步骤后，将上清液转移到新的离心管中。在此过程中，管内留存 1 mL 培养基，以防止在转移时吸取细胞、细胞碎片、凋亡小体或微泡体颗粒。在完成最后一道离心步骤后，约有 470 mL 澄清培养基可用于超速离心。使用配有 P32ST 水平转子的 CP100NX 超速离心机，只需运行两次即可完成两台 BioBLU 0.3c 一次性生物反应罐的离心(图 5B/C)，从而减少了外泌体收集过程中的工作步骤和时间。

从粗培养基中收集外泌体，首先以 100,000 x g 离心，然后以相同的速度进行二次离心；但若使用蔗糖密度梯度离心，则可收集更均一、纯净、完整的外泌体。为了节省时间，我们在离心管底部铺设 4 mL 30% 的蔗糖垫来取代蔗糖密度梯度离心步骤(图 5C)。使用蔗糖垫同样可获得完整、均一的外泌体，而无需在管内制备蔗糖梯度，从而节省了时间。

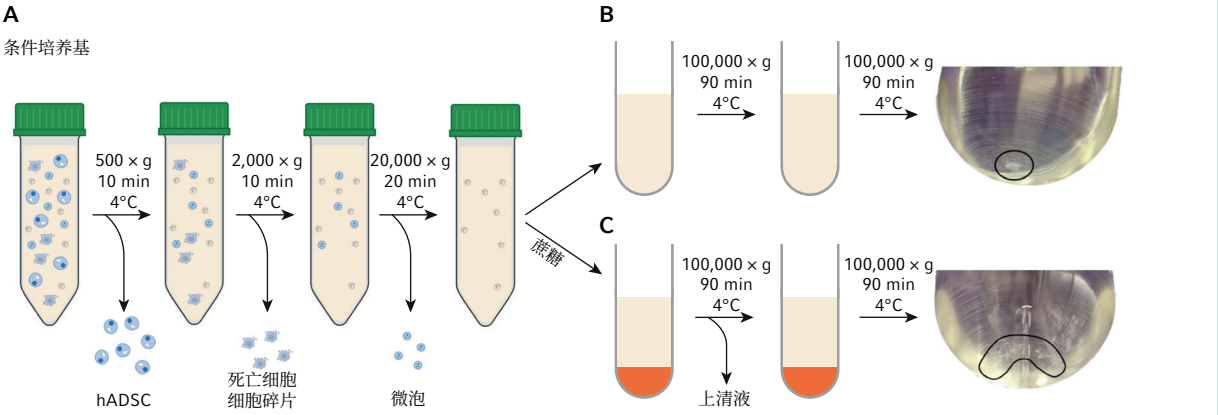


图 5：使用高速离心以清除培养基：(A) 使用配有 R15A 固定角转的 CR22N 高速离心机，(B) 无蔗糖垫的超速离心，或 (C) 使用配有 P32ST 水平转子的 CP100NX 超速离心机和蔗糖垫来沉淀外泌体。
* 使用 BioRender.com 绘制

在本 Application Note 中，我们将蔗糖垫离心法与不含蔗糖的两个连续离心步骤进行了比较（图 5B/C）。在两次超速离心步骤之后，不同方法的外泌体沉降物形状明显不同。事实上，无蔗糖垫离心法在试管底部产生了浓缩的沉降物（图 5B），而蔗糖垫离心法（图 5C）产生了更加分散的沉降物。发生这种情况的原因为：外泌体可穿过蔗糖垫，呈直线状更缓慢地沉淀到试管底部，而无蔗糖垫时沉降物将凝聚到同一位置。

外泌体表征和定量

超速离心后，将外泌体沉降物重悬于 PBS 溶液中，并使用 DLS、电子显微镜（图 6A）和 ELISA（图 6B）进行表征。DLS 用于确定 PBS 悬浮液中小颗粒的粒度分布状况，从而确定外泌体的同质性。如上所述，同时使用新鲜的无条件无异源培养基（RoosterCollect-EV）作为阴性对照。DLS 检测结果显示，在实验的最后 48 小时，用于收集外泌体的 RoosterCollect-EV 培养基中不含任何外源外泌体。蔗糖垫离心法和无蔗糖垫离心法分离的外泌体的 DLS 检测结果显示了外泌体的典型粒度分布，峰值在 100nm 左右（图 6A）。值得注意的是，两种方法的曲线下面积存在差异。事实上，无蔗糖垫离心法分离的外泌体峰宽更大，存在向更高粒度转移的趋势。相比之下，蔗糖垫离心法分离的外泌体峰宽更小，并且集中在较小的粒度范围内。因此，蔗糖垫离心法分离的外泌体群体更加完整、均匀，而无蔗糖垫离心法分离的外泌体群体则具有更大的异质性。这一数据得到了电子显微镜观察结果的证实（图 6A）。该分析结果证实了我们之前的观察。RoosterCollect-EV 培养基中未检测到外泌体（阴性对照）。无蔗糖垫分离的外泌体群体更大且不均匀，而蔗糖垫分离的外泌物则更小且更均匀，检测到的碎片也更少（图 6A）。

外泌体生物标志物的表达通过 CD63 的 ELISA 检测进行分析（图 6B）。使用这种方法检测到，两种外泌体分离方法具备类似的外泌体丰度。它还证实了 RoosterCollect-EV 阴性对照中不存在外源外泌体，且在样品中未检测到 CD63 的表达。该数据表明，使用 CR22N 高速离心机和 CP100NX 超速离心机进行分离可实现更高的外泌体产量。此外，在超速离心步骤期间使用蔗糖垫可以收集丰富且均匀的外泌体。

结论

配备 BioBLU 0.3c 一次性生物反应罐的 DASbox 迷你生物反应器系统可为外泌体生产工作流程提供高效的上游工艺优化：它能够平行处理 4 台 100 至 250 mL 工作体积的生物反应器，并且精确控制关键工艺参数，如温度、pH 值、溶氧和气体流量。

确保外泌体纯度和质膜完整性是外泌体分离过程中的重大挑战。沉淀或色谱等纯化和分离方法会因操作缓冲液而产生外泌体聚集或降解。被称为“ 黄金标准 ”的超速离心法能够以相对较低的成本从大量生物材料中分离外泌体，并且无需使用可能污染外泌体制剂的化学试剂。然而，超速离心法也存在缺点，例如需要完成大体积培养基的重复离心步骤，并且分离效率取决于所选转子类型（固定角转或水平转子）及其容量大小；另一点是外泌体组分中可能存在非外泌体杂质。为了提高纯度和完整性，通常在蔗糖梯度（2.0-0.25 M）中分离外泌体，并在 210,000 x g 的速度下离心长达 16 小时。为了改进方案并节省时间，我们使用蔗糖垫液法进行超速离心可将每次离心时间缩短至仅需 90 分钟。

研究结果表明，使用配有 BioBLU 0.3c 一次性生物反应罐的 DASbox 迷你生物反应器系统以及高速和超速离心机，能够建立一套成功收集完整度高和均一性好的人脂肪干细胞来源外泌体的工作流程。CR22N 高速离心机配备了能够同时容纳 10x15TC 和 10x50TC 锥底管的 R15A 固定角转，单次离心容量高达 650 mL。使得其可在 1 小时内清除 650 mL 培养基中的细胞、细胞碎片、微泡体等杂质，从而节省时间、减少重复工作。同样的，CP100NX 超速离心机配备了能够同时容纳 6x40 mL 离心管的 P32ST 水平转子，最多可容纳 240 mL 培养基。

由于具备高容量的特性，CR22N 高速离心机仅需运行一次，即可完成对两台 BioBLU 0.3c 一次性生物反应罐中培养基成分的清除；而 CP100NX 超速离心机仅需运行两次，即可浓缩外泌体。如此一来，整个过程耗时不到 4 小时，表明该工作流程有助于提高工艺开发期间的时间管理效率。

参考文献

[1] Liebner S, Cavallaro U & Dejana E. The multiple languages of endothelial cell-to-cell communication. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26, 1431–1438 (2006).

[2] Yoon YJ, Kim OY & Gho YS. Extracellular vesicles as emerging intercellular communicasomes. BMB Reports vol. 47 531–539 Preprint at https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.10.164 (2014).

[3] Tetta C, Ghigo E, Silengo L, Deregibus MC & Camussi G. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. Endocrine 44, 11–19 (2013).

[4] Iraci N, Leonardi T, Gessler F, Vega B & Pluchino S. Focus on extracellular vesicles: Physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles. Int J Mol Sci 17, (2016).

[5] Yuana Y, Sturk A. & Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. Blood Rev 27, 31–39 (2013).

[6] Robbins P D & Morelli AE Regulation of immune responses by extracellular vesicles. Nat Rev Immunol 14, 195–208 (2014).

[7] Raposo G & Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. Journal of Cell Biology vol. 200 373–383 Preprint at https://doi.org/10.1083/jcb.201211138 (2013).

[8] Tamkovich SN., Tutanov OS & Laktionov PP. Exosomes: Generation, structure, transport, biological activity, and diagnostic application. Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology 2016 10:3 10, 163–173 (2016).

[9] Witwer KW et al. Updating MISEV: Evolving the minimal requirements for studies of extracellular vesicles. J Extracell Vesicles 10, (2021).

[10] Stahl PD & Raposo G. Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis. Physiology (Bethesda) 34, 169–177 (2019).

[11] Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS & Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. J Neurooncol 113, 1 (2013).

[12] Pan BT & Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. Cell 33, 967–978 (1983).

[13] Qiu P, Zhou J, Zhang J, Dong Y & Liu Y. Exosome: The Regulator of the Immune System in Sepsis. Front Pharmacol 12, 880 (2021).

[14] Liu W. et al. Role of Exosomes in Central Nervous System Diseases. Front Mol Neurosci 12, 240 (2019).

[15] Liu J et al. The biology, function, and applications of exosomes in cancer. Acta Pharm Sin B 11, 2783–2797 (2021).

[16] Dai J et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. Signal Transduction and Targeted Therapy 2020 5:1 5, 1–10 (2020).

[17] Hoen EN, Cremer T, Gallo RC & Margolis LB Extracellular vesicles and viruses: Are they close relatives? Proc Natl Acad Sci U S A 113, 9155–9161 (2016).

[18] Lin Y, Anderson JD, Rahnama LMA, Gu Sv & Knowlton AA. Exosomes in disease and regeneration: biological functions, diagnostics, and beneficial effects. Am J Physiol Heart Circ Physiol 319, H1162–H1180 (2020).

[19] Huda MN et al. Potential Use of Exosomes as Diagnostic Biomarkers and in Targeted Drug Delivery: Progress in Clinical and Preclinical Applications. ACS Biomater Sci Eng 7, 2106–2149 (2021).

[20] Xu L, Wu LF & Deng FY. Exosome: An Emerging Source of Biomarkers for Human Diseases. Curr Mol Med 19, 387–394 (2019).

[21] Muthu S, Bapat A, Jain R, Jeyaraman N & Jeyaraman M. Exosomal therapy—a new frontier in regenerative medicine. Stem Cell Investig 8, (2021).

[22] Tejerina S, Dufey V, Hoet JF, Tacheny A & De Longueville F. The DASbox® Mini Bioreactor System as a Tool for Process Development And Stem-Cell Derived Exosome Production in Standardized Culture Conditions. (2021).

[23] Escobar Ivirico JL, Suttle A & Sha M. SciVario® twin Self-Scale-up of CHO Culture-Based Antibody Production from BioBLU ® 3c to BioBLU ® 50c Single-Use Bioreactor. www.eppendorf.group/sci-vario (2022).

[24] Escobar Ivirico JL & Sha M. Stem Cell Exosome Production on the SciVario® twin, a Flexible Controller for Your Bioprocess Needs. (2020).
[25] Ludwig N, Whiteside TL & Reichert TE. Challenges in Exosome Isolation and Analysis in Health and Disease. Int J Mol Sci 20, (2019).
[26] Sidhom K, Obi PO & Saleem AA. Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? Int J Mol Sci 21, 1–19 (2020).
[27] Tauro BJ et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. Methods 56, 293–304 (2012).
[28] Szatanek R, Baran J, Siedlar M & Baj-Krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (review). International Journal of Molecular Medicine vol. 36 11–17 Preprint at https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2194 (2015).
[29] Livshts MA et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. Sci Rep 5, (2015).
[30] Chen J et al. Review on Strategies and Technologies for Exosome Isolation and Purification. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology vol. 9 Preprint at https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.811971 (2022).
[31] Kotmakçı M & Akbaba GE. Exosome Isolation: Is There an Optimal Method with Regard to Diagnosis or Treatment? in Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases (InTech, 2017). doi:10.5772/intechopen.69407.
[32] Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Qasim M & Kim JH. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. Cells 8, (2019).
[33] Momen-Heravi, F et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. Biological Chemistry vol. 394 1253–1262 Preprint at https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0141 (2013).
[34] Patel GK et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. Scientific Reports 2019 9:1 9, 1–10 (2019).
[35] Gupta S et al. An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther 9, 1–11 (2018).
[36] Lane RE, Korbie D, Anderson W, Vaidyanathan R & Trau M. Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. Sci Rep 5, (2015).

订购信息

描述	货号
DASbox® 迷你生物反应器系统, 用于细胞培养, 4 罐体系统, 适用一次性生物反应罐体	76DX04CCSU
BioBLU® 0.3c 一次性生物反应罐体, 细胞培养, 开放管路, 1 个斜叶搅拌桨, 无 pH 电极, 无菌, 4 件	1386 100 000
DASware® control 软件, 含 PC、OS 和许可证, 适用 4 罐体 DASbox® 迷你生物反应器系统	7860 016 7
CR22N 高速落地离心机	查询 *
CP100NX 超速离心机	查询 *
R15A 转子, 用于 CR22N, 最大转速 15,000 rpm, 最大相对离心力 32,200 x g	5721 221 007
P32ST 转子, 用于 CP-NX 系列, 最大转速 32,000 rpm, 最大相对离心力 180,000 x g	5720 214 003
Eppendorf ThermoMixer® C, 不带加热模块的基本设备	5382 000 015
50TC 离心管(100 根), 50mL	5721 221 007
15TC 离心管(100 根), 15mL	5721 302 110
40PET 离心管(50 根), 40mL	5720 411 148

*Inquire the part number for your country

www.eppendorf.cn

艾本德中国

服务热线：400 885 6070 电子邮件： marketinfo@eppendorf.cn

Beckman Coulter® and Vi-CELL® are registered trademarks of Beckman Coulter, Inc., USA. BioCoat®, Synthemax® and Corning® are registerd trademarks of Corning Inc., USA. RoosterBio® is a registered trademark of RoostrBio Inc., USA. Zetasizer® is a registered trademark of Malvern Panalytical Ltd., UK. Thermo Fisher Scientific® is a registered trademark of Thermo Fisher Scientific Inc., USA. Eppendorf®, the Eppendorf Brand Design, BioBLU®, and ThermoMixer® are registered trademarks of Eppendorf SE, Germany. DASbox® and DASware® is a registered trademark of DASGIP Information and Process Technology GmbH, Germany.
All rights reserved, including graphics and images. Copyright © 2023 by Eppendorf SE.

Eppendorf SE reserves the right to modify its products and services at any time. This application note is subject to change without notice. Although prepared to ensure accuracy, Eppendorf SE assumes no liability for errors, or for any damages resulting from the application or use of this information. Viewing the application note alone cannot as such provide for or replace reading and respecting the current version of the operating manual.

AA476-020-02-082023