اگزومِد

کیت جداسازی اگزوزوم

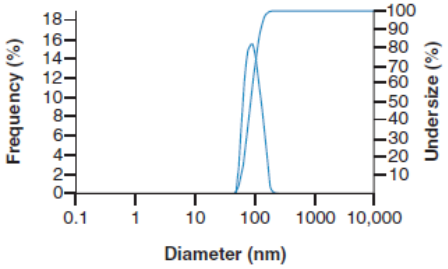
اگزوزوم‌ها، وزیکول‌های خارج سلولی در اندازه نانو (۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر) بوده که دارای غشای دو لایه فسفولیپیدی و یک هسته ی آبدوست (فضای داخلی وزیکول) می باشند. سلول‌های مختلف همواره قادر به ترشح این نانو وزیکول ها هستند که حاوی محموله‌های مختلفی مانند DNA، RNA، لیپیدها، پروتئین‌ها و غیره می باشند. اگزوزوم‌ها بسته به نوع سلول مولد و باتوجه به ماموریت آنها، در مسیرهای مختلف مانند ارتباطات بین سلولی، انتقال سیگنال، ارائه آنتی ژن و پیشرفت تومور نقش دارند. بنابراین محتوای بیولوژیکی اگزوزوم‌ها متفاوت خواهد بود.

کیت **"اگزومِد"** محصولی است که یک روش ساده، قابل اعتماد و تکرارپذیر برای استخراج اگزوزوم های دست نخورده از محیط کشت سلولی، ارائه می دهد. با صرف زمان کم، بازده بالا، بدون استفاده از سانتریفیوژها با دور بالا و نیز سایر تجهیزات پیشرفته و بصورت کاملا استریل قادر به جداسازی اگزوزوم از هر مقدار و حجم نمونه اولیه است. وزیکول‌های اگزوزومی جدا شده توسط این محصول برای کاربردهای مختلف پایین دستی مانند آنالیز میکروسکوپ الکترونی، آنالیز NTA، وسترن بلات، PCR کمی و توالی یابی با توان عملیاتی بالا و غیره مناسب است.

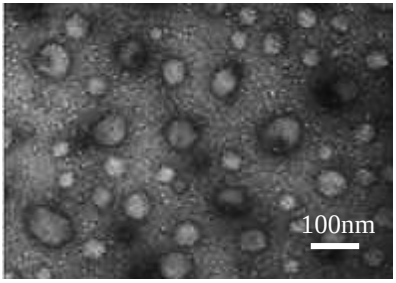
- محتوای کیت:

۱) بافر ۱: حاوی ۲۵ میلی لیتر

۲) بافر ۲: حاوی ۵ میلی لیتر



Size distribution by DLS



Transmission Electron Microscopes (TEM)

- نحوه نگهداری کیت:

کیت در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد (یخچال) و به دور از نور نگهداری شود.

بافرها حداقل ۶ ماه در ظروف باز نشده پایدار می مانند.

توجه داشته باشید کلیه بافرها استریل شده می باشند. برای هربار استفاده از بافرها، پیپت یا نوک سمپلر استریل (بهتر است کلیه وسایل در جداسازی اگزوزوم RNase free باشند) بکار برده و سپس درب بافرها محکم بسته شوند.

- شیوه استفاده از کیت:

۱) نمونه (عموما محیط کشت سلول) را به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت RPM × ۴۰۰۰ (دمای اتاق) سانتریفیوژ کنید تا ذرات و زباله‌های سلولی حذف شوند.

۲) برای بدست آوردن نتیجه بهتر، محیط رویی حاصل از مرحله ۱را از فیلتر ۰,۲۲ میکرومتر عبور دهید.

۳) پیش از استفاده بافر ۱ را ورتکس کرده و تا دمای ۳۷ درجه سانتیگراد حرارت دهید تا قبل از استفاده اگر کریستال‌هایی تشکیل شده اند، ناپدید شوند.

۴) نمونه حاصل از مرحله ۲، به نسبت ۴ به ۱ با بافر ۱ مخلوط کنید (برای مثال ۴ میلی لیتر نمونه + ۱ میلی لیتر بافر ۱).

برای بدست آوردن نتیجه بهتر، این مرحله در فالکون جدید (حتی المقدور فالکون نو) انجام دهید.

۵) مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه ورتکس شود تا از یکنواختی مخلوط اطمینان حاصل کنید. در این مرحله، بسته به غلظت نمونه اولیه، ظاهر ابری قابل مشاهده خواهد بود.

۶) درب فالکون حاوی مخلوط کاملا بسته شود و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه کنید.

برای بدست آوردن نتیجه بهتر، می توان از دستگاه تکان دهنده اتوماتیک (شیکر) در مدت انکوباسیون استفاده کنید یا هر یک ساعت فالکون به صورت دستی تکان داده (سر و ته) شود.

۷) پس از اتمام زمان انکوباسیون، فالکون به مدت ۱ دقیقه ورتکس شود تا از یکنواختی مخلوط اطمینان حاصل کنید.

۸) سپس به مدت ۴۰ دقیقه با سرعت RPM × ۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ کنید.

۹) سپس مایع رویی (سوپرناتانت) را کاملا تخلیه کرده و دور بریزید.

۱۰) پیش از استفاده بافر ۲ را ورتکس کرده و مطمئن شوید ته نشین نشده است. به رسوب تشکیل شده در مرحله ۹ به مقدار مناسب بافر ۲ اضافه کنید. به آهستگی بافر ۲ را با رسوب مخلوط کنید توجه داشته باشید از تشکیل حباب اجتناب گردد.

مقدار بافر ۲ مورد استفاده در این مرحله، به غلظت نمونه اولیه (عموما محیط کشت سلول که در مرحله ۱ جهت تخلیص اگزوزوم به کار برده شد) بستگی دارد، که می تواند از ۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر متغیر باشد. توجه داشته باشید رسوب حاصل حاوی اگزوزوم خالص است و مقدار بافر ۲ بکار برده شده باید به میزانی باشد که هم رسوب به صورت یکنواخت حل شود هم منجر به رقیق شدن بیش از حد نمونه و کاهش کیفیت آن نشود.

۱۱) اگزوزوم تخلیص شده را می توان در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت چند روز و در دمای ۲۰- تا ۸۰- درجه سانتیگراد به مدت طولانی نگهداری کرد.

برای جلوگیری از فریز و دیفریز شدن متناوب نمونه حاوی اگزوزوم و درنتیجه کاهش کیفیت اگزوزوم، بهتر است در این مرحله نمونه حاصل را در میکروتیوب هایی تقسیم کرده و برای هر بار استفاده و انجام تست های کمی و کیفی مانند غلظت سنجی و ... یکی از میکروتیوب ها را دیفریز و استفاده کنید.