

EuroClone:
Guida al mondo degli
ESOSOMI

Gli esosomi sono vescicole di diametro tra 30 e 200nm, secreti dalle cellule nei fluidi biologici: sangue, urine, fluido amniotico, asciti, liquido cerebrospinale, ecc.

Secondo la derivazione cellulare, gli esosomi contengono diverse molecole, e veicolano segnali attraverso il contenuto di RNA, in particolare microRNA, proteine, lipidi e DNA.

Gli esosomi sono quindi coinvolti in numerosi processi fisiologici e patologici, come tumorigenesi, infiammazione e meccanismi che regolano l'immunità. Approfondire le funzioni biologiche degli esosomi può consentire il loro utilizzo come biomarcatori di malattia e nello sviluppo di terapie.

01 - Isolamento

• Ultracentrifuga

Metodo di elezione per la purificazione di esosomi, ma favorisce la formazione di aggregati proteici e lipoproteici che co-precipitano con gli esosomi, e di detriti cellulari, con la deformazione/rottura delle vescicole ("splat factor").

La metodica è laboriosa, richiede strumentazione dedicata (ultracentrifuga) ed è poco adatta a lavorare con molti campioni o con piccoli volumi.

• Precipitazione Polimerica

Metodo rapido per l'isolamento degli esosomi, senza ultracentrifuga, adatto anche a piccoli volumi e numeri elevati di campioni.

ExoQuick (System Biosciences, SBI) consente di isolare gli esosomi da colture cellulari o biofluidi, con formulazioni specifiche secondo la tipologia di campione, a partire da volumi ridotti (250ul), con modalità scalare (disponibile anche in formulazione cGMP).

ExoQuick-LP include un pre-trattamento per eliminare dal campione i contaminanti lipoproteici.

ExoQuick-TC è specifico per l'isolamento degli esosomi da terreno di coltura.

Per questa applicazione, è consigliabile l'uso di Exo-FBS (SBI),

siero utile per evitare la contaminazione dei terreni

di coltura perché depletato da esosomi bovini, che possono interferire con l'analisi.

Exiqon fornisce sistemi analoghi per l'isolamento di esosomi da biofluidi o medium di coltura, con i relativi kit di estrazione di RNA.

• Size Exclusion

Filtrazione e cromatografia, tipicamente utilizzate in abbinamento all'ultracentrifuga.

• Immunoprecipitazione

Per isolare gli esosomi mediante anticorpi specifici per proteine di superficie, anche in abbinamento alle metodiche descritte sopra.



03 - Caratterizzazione

• Quantificazione degli RNA associati a esosomi: qPCR e NGS

Gli RNA associati ad esosomi sono molteplici (microRNA, tRNA, rRNA, mRNA, lncRNA) e possono essere analizzati mediante *qPCR* o *Next Generation Sequencing* (NGS).

La RT Universale di **Exiqon** consente di retrotrascrivere contemporaneamente tutti i miRNA presenti nel campione, con la stessa efficienza, riducendo la quantità di campione necessaria, i tempi e le variabili tecniche.

Il cDNA così ottenuto viene impiegato come template per la Real-Time PCR, specifica per ciascun miRNA, grazie a primer set specifici, con modifiche a LNA (*Locked Nucleic Acid*): questa modifica chimica rende il sistema altamente riproducibile e specifico, poichè entrambi i primer riconoscono il miRNA target, permettendo la rilevazione dei soli miRNA maturi e di distinguere sequenze che differiscono per un singolo nucleotide.

I kit NEBNext (*New England Biolabs - NEB*) consentono la preparazione di library di RNA e smallRNA per piattaforma NGS Illumina, a partire da 10ng (*NEBNext Ultra RNA Library Prep kit*) e 100ng (*NEBNext small RNA library Prep kit*):

i protocolli sono ottimizzati per ridurre i tempi di manipolazione dei campioni, con riduzione delle variabili tecniche e dei tempi di preparazione della library. E' possibile quantificare le library prodotte mediante specifico kit per qPCR.

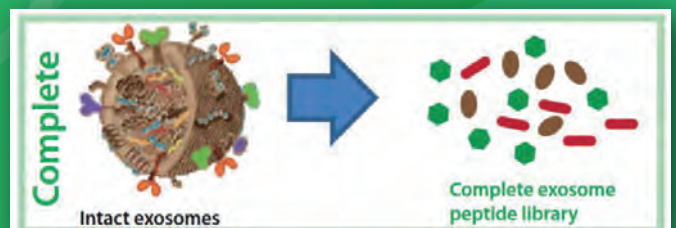
SBI offre un service di NGS per identificare nuovi potenziali biomarcatori tra gli RNA esosomali.

• Caratterizzazione delle proteine esosomali

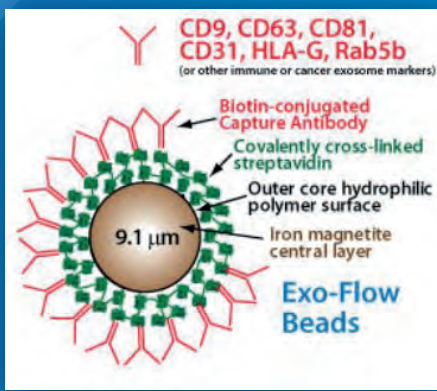
Gli esosomi presentano specifiche proteine sulla loro superficie e sono caratterizzati da uno specifico pattern di proteine trasportate al loro interno. Oltre alla caratterizzazione tramite FACS (ExoFLOW), Western Blot (ExoAb) ed ELISA (ExoELISA), sono disponibili anche sistemi per la preparazione degli esosomi per la successiva analisi di spettrometria di massa:

il kit XPEP (SBI) permette di generare library di proteine di superficie, attraverso lo 'shaving' della membrana esosomale, oppure library di proteine totali, analizzabili direttamente sullo strumento di spettrometria di massa.

XPEP kit è compatibile con esosomi isolati con tutti i metodi disponibili.



02 - Rilevazione e Quantificazione



E' possibile caratterizzare gli esosomi mediante anticorpi specifici per proteine di superficie (**ExoAb** e **ExoCheck Array** - SBI) o kit per la quantificazione in ELISA o citofluorimetria (**ExoFlow**, **ExoELISA**, **ExoCET** - SBI).

• Sistemi di rilevazione con anticorpi

Anticorpi ed array specifici permettono di caratterizzare gli esosomi in base alle proteine di superficie. **SBI** fornisce anticorpi per i tipici marcatori esosomali (CD63, CD9, CD81, HSP70) e per marcatori esosomali tessuto-specifici: CETP, ANXA5-1, TSG101, EpCam, Vimentin, ALIX, FLOTILLIN-1. Per esosomi generati da linfociti B e T è disponibile l'anticorpo per CXCR4.

• Quantificazione degli esosomi - anticorpi

Gli esosomi possono essere quantificati mediante citofluorimetria o ELISA.

I kit **ExoFlow** (SBI) consentono la quantificazione e il sorting di specifiche sotto-popolazioni esosomali.

Poichè le dimensioni ridotte degli esosomi non ne consentono la visualizzazione diretta in citometria,

ExoFlow utilizza beads coniugate con anticorpi per antigeni di superficie esosomali, per ottenere cluster di dimensioni maggiori, che risultano così visibili al citofluorimetro. Sono disponibili kit anti CD63, CD9, CD81, HSP70.

Le beads hanno proprietà magnetiche, perciò lo stesso sistema può essere impiegato anche per immunoprecipitazione.

Sono disponibili anche sistemi ELISA per la quantificazione delle proteine esosomali di membrana.

• Quantificazione degli esosomi - attività enzimatica

ExoCET misura l'attività dell'Acetil-CoA Acetilcolinesterasi, marcatore tipicamente esosomale, tramite un saggio colorimetrico diretto: ogni kit include lo standard di peptidi esosomali purificati per la curva di calibrazione.

FluoroCET è un sistema analogo ad ExoCET per la misurazione dell'attività dell'Acetil-CoA Acetilcolinesterasi, ma con readout fluorescente, fino 7 volte più sensibile.

04 - Studi Funzionali

• Marcatura

Il contenuto di RNA o proteine degli esosomi può essere marcato con il colorante fluorescente **Exo-Glow** (SBI, Red per RNA e Green per proteine), per tracciarne il percorso all'interno della cellula.

E' sufficiente un'incubazione con Exo-Glow degli esosomi purificati, prima di aggiungerli al medium per studiare l'interazione esosomi - cellule target e monitorare la localizzazione del contenuto esosomale dopo l'internalizzazione.

• Exosome Transfection

Utilizzati per il trasporto di segnali extracellulari, gli esosomi hanno un notevole potenziale per studi funzionali o per la terapia, come veicolo per il trasporto di molecole all'interno di cellule resistenti ai più comuni metodi di trasfezione.

ExoFect (SBI) consente la trasfezione di esosomi con plasmidi, mRNA o lncRNA e piccole molecole.

Gli **EV Shuttle Kit** (SBI) combinano ExoFect ed esosomi purificati con uno scramble siRNA fluorescente per monitorare l'efficienza di trasfezione.

L'uso dell' enhancer **EV-Entry** (SBI), migliora l'efficienza di uptake degli esosomi trasfettati nelle cellule target.

• Exosome Tagging

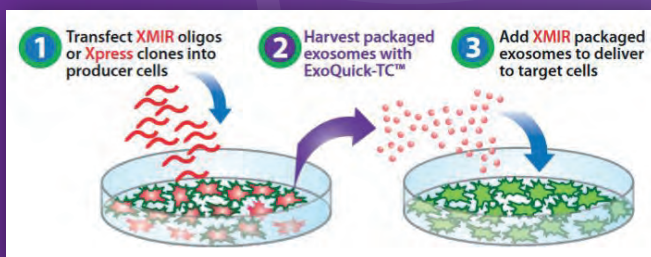
E' possibile produrre esosomi contenenti specifiche molecole (RNA e proteine) mediante un sistema di Tagging: le cellule vengono trasfettate con vettori esprimenti RNA o proteine con apposite "Tag" per la localizzazione esosomale, ottenendo così la produzione di esosomi con specifici "cargo". Il vettore lentivirale di espressione, dopo packaging, può essere impiegato per infezione, consentendo la produzione stabile di esosomi con il contenuto di interesse.

- **XMIR e AXMIR**: per l'espressione di miRNA e anti-miRNA taggati per il packaging all'interno degli esosomi

- **XPort**: per caricare mRNA all'interno degli esosomi tramite una sequenza Zipcode. Disponibili con Tag fluorescente RFP o Luciferasi.

- **XPack**: per produrre proteine con un tag per il packaging all'interno degli esosomi. Sono disponibili versioni per l'espressione di Luciferasi o GFP, per il tracking degli esosomi, o vettori vuoti per una completa customizzazione.

- **X-Stamp**: per l'espressione di proteine sulla membrana degli esosomi: l'esposizione della proteina sulla superficie esosomale consente il target-delivery verso cellule che esprimano il corrispondente recettore, creando così un sistema ottimizzato per la somministrazione di molecole a specifici tipi cellulari. Sono disponibili vettori pre-designed X-Stamp per miotilina, EGFR, Her2, CD40L, IL2.



O1 - Isolamento

SBEXOQ5A1	ExoQuick serum exosome precipitation solution (5 ml)	75 reactions	EX300101	miRCURY Exosome Isolation Kit Serum and Plasma	Recommended with EX300112
SBEXOTC10A1	ExoQuick-TC for Tissue Culture Media and Urine (10 ml)	10 reactions	EX300102	miRCURY Exosome Isolation Kit Cells, urine and CSF	Recommended with EX300110
SBEXOCG50A1	ExoQuick-CG cGMP-grade Exosome Isolation reagent (50 ml)	30 reactions	EX300112	miRCURY RNA Isolation Kit Biofluids	50 reactions
SBEXOFBS50A1	Exosome-depleted FBS Media Supplement - USA Certified	50 ml	EX300110	miRCURY RNA Isolation Kit Cell and Plant	50 reactions
SBEXOLP5A1	ExoQuick-LP Lipoprotein Pre-Clear & Exosome Precipitation Kit	5 reactions			

Lista completa dei prodotti e formati disponibili al link: <https://www.systembio.com/microma-research/exoquick-exosomes/ordering>

O2 - Rilevazione e Quantificazione

SBEXOABKIT1	ExoAb Antibody Kit (CD9, CD63, CD81, Hsp70)	25 ul each	SBEXOFLOWBASICA1	Basic Exo-Flow kit without any coupled antibodies	100 Reactions
SBEXOCET96A1	EXOCET Exosome Quantitation Kit	96 Reactions	SBEXOELCD63A1	Exosome ELISA Complete Kit (CD63 detection)	96 Reactions
SBFCET96A1	FluoroCET Exosome Quantitation Kit	96 Reactions	SBEXOELCD81A1	Exosome ELISA Complete Kit (CD81 detection)	96 Reactions
SBEXORAY4	Exo-Check Exosome Antibody Array	4 Arrays	SBEXOELCD9A1	Exosome ELISA Complete Kit (CD9 detection)	96 Reactions
SBEXOFLOW150A1	Tetraspanin Exo-Flow combo capture kit (CD9, CD63, and CD8)	10 Reactions			

Lista completa dei prodotti e formati disponibili al link: <https://www.systembio.com/microma-research/exosome-antibody/ordering>

O3 - Caratterizzazione

EX203351 STARTER KIT	All reagents required to do 20 cDNA reactions and 100 PCR reactions. Kit includes spike control (UniSp6), potential endogenous control (miR-103a-3p) and two validated primers free of choice	-
BE7370S/L	NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina®	24/26 reactions
BE7420S/L	NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit for Illumina®	24/26 reactions
BE7300S/L	NEBNext® Ultra™ Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (Set 1)	24/26 reactions
BE7630S	NEBNext® Ultra Library Quant Kit for Illumina®	100 reactions
SBXPEP100A1	XPEP Exosome Mass Spec sample prep kit	8 reactions

O4 - Studi Funzionali

SBEXOR100A1	Exo-Red exosome RNA fluorescent label	20 reactions	SBEVS105A1	EV Shuttle Kit Human HEK293 cell exosomes	5 reactions
SBEXOG200A1	Exo-Green exosome protein fluorescent label	20 reactions	SBEVEN105A1	EV-Entry System for Exosome Delivery	5 reactions
SBEXOC300A1	Exo-Red + Exo-Green exosome cargo fluorescent label Combo Pack (10 rxns of each label)	20 reactions	SBXSTP710PA1	XStamp cloning and expression lentivector MSCV-Leader-MCS-C1C2-EF1-Puro	10 µg
SBEXFT10A1	Exo-Fect Exosome Transfection Kit	10 reactions	SBXSTP720PA1	XStamp MLN exosome Motilin receptor GI tract targeting lentivector	10 µg
			SBXSTP724PA1	XStamp Her2 ligand exosome Her receptor targeting lentivector	10 µg
			SBXSTP726PA1	XStamp IL2 exosome IL-2 receptor targeting lentivector	10 µg

Lista completa dei prodotti e formati disponibili al link: <https://www.systembio.com/exosome-research-ev-shuttles/ordering>
<https://www.systembio.com/xmir-package-mirnas-exosomes/ordering>
<https://www.systembio.com/xpack-exosomes/ordering>
<https://www.systembio.com/xstamp-exosomes>

EuroClone S.p.A.

Via Figino, 20/22 • 20016 Pero (MI) Italy • ☎ +39 02 38195.1 • 📠 +39 02 38101465 • ✉ info@euroclone.it • www.euroclone.it

Quality Management Systems certified according to ISO 9001 and ISO 13485 international standards