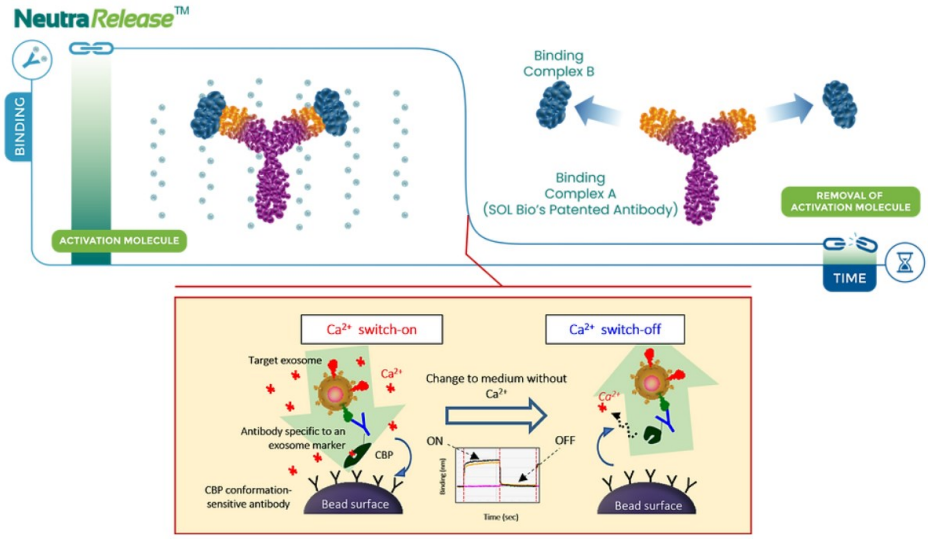
SOLBIO

Liquid Biopsy for Early Disease Screening

엑소좀 아집단, 차아집단 샘플 제조 키트

NeutraRelease™



'Ca^{2+} switch-on/off binding reaction' 기반 자성분리

실험실 수준에서의 범용 장비를 이용한
Exosome Biomarker Discovery 실험 도구

SOLBIO는 'NeutraRelease™' 키트의 공급을 통해, 엑소좀 표면에 존재하는 바이오마커에 특이한 항체를 이용하는 새로운 자성분리 기술 즉, **'Ca^{2+} switch-on/off binding reaction'**을 기반으로 엑소좀 아집단 분리 및 회수를 위한 도구를 제공합니다.

1) **엑소좀 샘플 전처리:** 혈청 등 샘플 내 함유한 엑소좀 모집단 준비
2) **엑소좀 아집단 분리:** 특정 타겟 바이오마커 포함 엑소좀 아집단의 자성분리
3) **엑소좀 회수:** 자성비드 상에 포획된 엑소좀을 중성 pH에서 용액 내로 용출시켜 회수

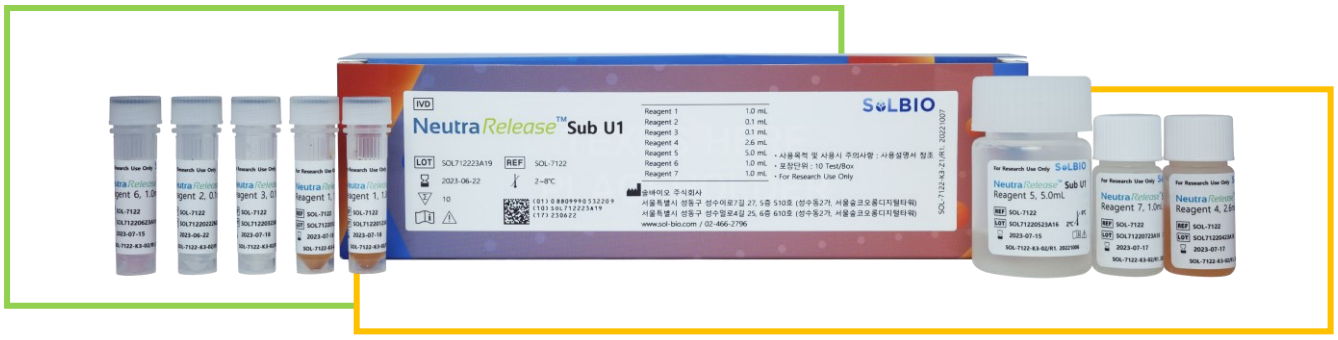
이와 같이 회수된 엑소좀 아집단은 다른 두번째 마커(예: 다른 tetraspanin 마커)를 갖는 엑소좀 차아집단으로 분리하는 샘플로 이용될 수 있습니다.

✓ 따라서, 차아집단 마커 분석 시, **엑소좀 집단의 이질적 특성이 감소되고**
✓ 나아가, **새로운 엑소좀 바이오마커의 발굴을 위한 분석 정확도가 현저히 증가됨**

SOL Bio Corporation
Head Office, Research Center
STE 510, 27, Seongsui-ro 7-gil, Seongdong-gu, Seoul, South Korea 04780
Development Center, GMP Facility
STE 610, 25, Seongsuil-ro 4-gil, Seongdong-gu, Seoul, South Korea 04780

NeutraRelease™ 엑소좀 분리 및 회수 키트

2022년 12월 조달청 혁신제품 선정



Title	Component name	Function	Container
Reagent 1	Reversible linker-coupled magnetic bead	Detachably capturing exosome onto magnetic bead	1.0 mL × 2 tubes
Reagent 2	Biotinylated anti-CD9 antibody	Binding to the CD9-bearing exosome in sample	0.1 mL × 1 tube
Reagent 3	Biotin	Quenching the biotin binding sites remaining on streptavidin	0.1 mL × 1 tube
Reagent 4	Washing buffer	Removing the unbound components from the magnetic bead	2.6 mL × 1 bottle
Reagent 5	Binding buffer	Diluting reagents 2 & 3	5.0 mL × 1 bottle
Reagent 6	Sample binding buffer	Diluting test sample including exosome	1 mL × 1 bottle
Reagent 7	Elution buffer	Releasing the CD9-positive exosome from the magnetic bead	1 mL × 1 tube

엑소좀 **아집단** 분리 및 회수용 NeutraRelease™ 키트

Product Name	NeutraRelease™ Sub U1	NeutraRelease™ Sub U2	NeutraRelease™ Sub U3	NeutraRelease™ Sub U4 (In preparation)
REF (Cat. No.)	SOL-7122	SOL-7123	SOL-7124	SOL-7125
Target subpopulation	CD9+	CD63+	CD81+	CD151+

NeutraRelease™의 장점

가역적 링커 이용한 자성분리 및 용출

엑소좀 분리용 항체는 Ca^{2+}-의존성 가역적 링커(솔바이오㈜ 특허기술)에 의해 탈착 가능하도록 자성비드 상에 고정됨

엑소좀 아집단 고수율, 무손상 회수

엑소좀 아집단 즉, CD9+ 엑소좀, CD63+ 엑소좀, 혹은 CD81+ 엑소좀의 분리 및 회수율 = >90%

순차적 차아집단 분리 샘플로 이용

분리 및 회수된 엑소좀을 사용된 마커 외 다른 마커에 대해 순차적 분리 시 샘플로 이용 가능

참고로, 키트에 명시된 마커 외에 연구자가 관심있는 바이오마커를 사용하여 엑소좀 아집단을 분리하길 원하는 경우에는 당사에 Customized service에 대해 문의 바람.

NeutraRelease™ 차별적 특징

엑소좀 표면 바이오마커에 대한 고수율 분리, 무손상 회수

웨스턴 블롯 분석 시, 90% 이상의 엑소좀 아집단에 대한 고수율 분리 및 액상 회수에 대한 확인

- **분리 중 단계 별 샘플 준비**

1) PC3 세포주에서 생산된 엑소좀 모집단
2) NeutraRelease™ 키트(Sub U1~U3)를 이용하여 각 타겟에 대해 분리 후, 용액으로 용출시켜 회수한 엑소좀 아집단
3) 분리 시 자성비드에 포획되지 않은 엑소좀 부분
4) 자성비드로부터 엑소좀 용출 후 비드 상에 잔여한 엑소좀 부분

- **웨스턴 블롯 분석 대상**

Pan-exosomal tetraspanins (CD9, C63, 및 CD81), calnexin (대조군으로, 비엑소좀 단백질)

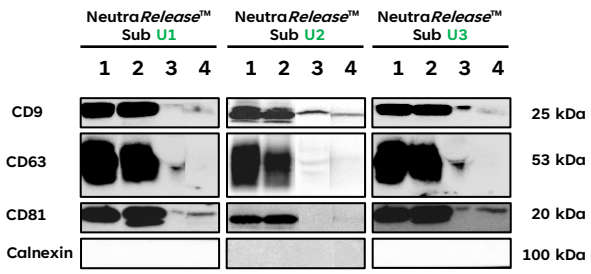


그림 1 NeutraRelease™ 키트를 사용하는 분리과정의 각 단계에서 채취한 엑소좀 샘플 내 주요 pan-exosomal tetraspanin 마커에 대한 웨스턴 블롯 분석

- **분리 결과** (그림 1)

모집단 (lane 1)으로부터 각 키트의 아집단 (lane 2) 분리 및 회수 성능
- Sub U1 : CD9 신호 비교 시, 분리 및 회수율 >90%
- Sub U2 : CD63 신호 비교 시, 분리 및 회수율 >90%
- Sub U3 : CD81 신호 비교 시, 분리 및 회수율 >90%

모집단 (lane 1) 대비 분리 후 샘플 내 엑소좀 잔여율 (lane 3)
- 각 키트 별 잔여율 <10%

분리 후 자성비드 상 잔여 엑소좀 (lane 4)
- 각 키트 별 잔여 엑소좀 : <5%

TEM 분석 결과, 자성비드로 부터 용출된 엑소좀의 구조적 보존성을 확인

- **샘플 준비**

CD63+ 아집단 분리: NeutraRelease™ Sub U2 키트 이용

- **엑소좀 구조 분석 방법**

1) CD9, CD63, 혹은 CD81 각 마커에 특이한 항체를 금 콜로이드로 표지
2) 각 마커에 특이한 표지된 항체를 CD63+ 아집단 엑소좀에 부착
3) 엑소좀의 구조를 투과전자현미경(TEM) 관찰하여 영상화

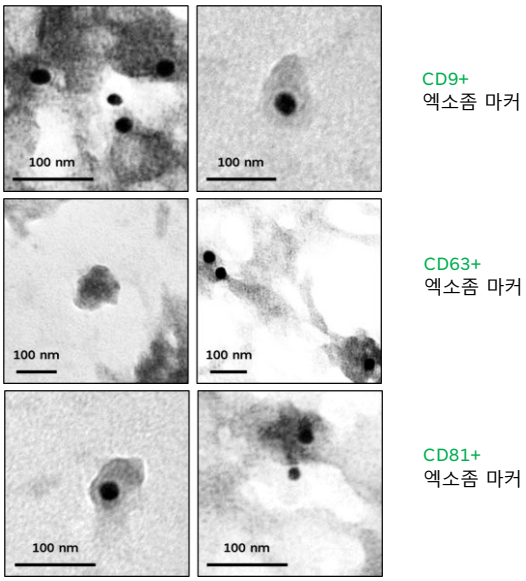


그림 2 다양한 엑소좀 tetraspanin에 대한 특이 항체를 금 입자로 표지하였고, 이를 이용하여 분리 및 회수된 CD63+ 아집단을 영상화한 TEM 이미지

- **영상화 결과** (그림 2)

엑소좀의 TEM 이미지로부터 엑소좀이 손상없이 회수되었음을 확인

NeutraRelease™ 의 활용성

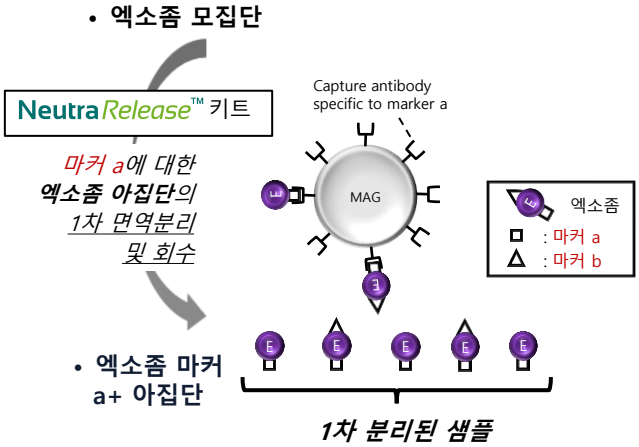
엑소좀 이질성 극복을 통한 신규 바이오마커 발굴 가능

NeutraRelease™ 키트를 이용하여 분리 및 회수된 엑소좀은 1차 사용된 마커 외에 다른 마커에 대해 순차적으로 분리하기 위한 샘플로 사용될 수 있음. 이와 같이 순차적으로 분리된 엑소좀은 모두 **동일한 2중 마커를 지니는 차아집단**으로 정확히 분류될 수 있음.

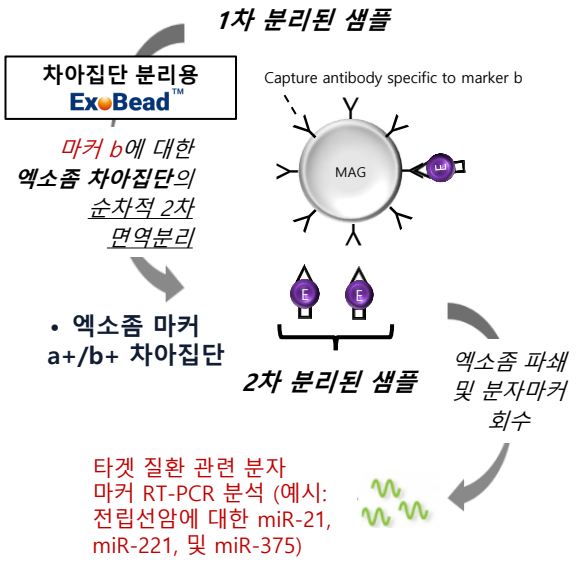
▪ 차별적 특성

이로 부터 얻은 **엑소좀 차아집단은** 1) **이질성이 현저히 감소**하므로, 2) 적절한 분리 마커를 선택할 경우 **신규 바이오마커 발굴을 위한 분리, 분석 샘플**로 이용될 수 있음.

▪ 엑소좀 아집단 샘플 제조



▪ 엑소좀 차아집단 샘플 제조



고순도 아집단, 차아집단 엑소좀의 순수샘플 제조

전립선암 세포주 PC3 엑소좀을 모집단으로 이용하여 아집단 및 차아집단 분리를 순차적으로 수행하였음.

▪ 제조 설계

분리용 특이항체
- 아집단: CD63 (NeutraRelease™ Sub U2 키트 이용)
- 차아집단: CD81 (ExoBead™ Sub C3 이용)

순수샘플 제조
- 모집단: 전립선암 세포주 PC3 엑소좀
- 아집단: CD63+/- 샘플
- 차아집단 샘플: CD63+/CD81+/- 샘플

샘플 분석방법 : 각 샘플에 대한 웨스턴 블롯

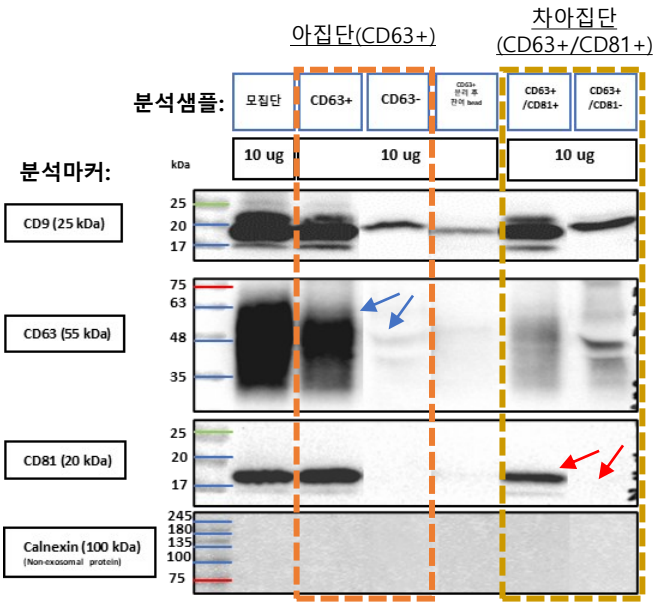


그림 3 웨스턴 블롯 분석을 통한 엑소좀 모집단, 아집단(CD63+), 차아집단(CD63+/CD81+) 분리 특성화

▪ 제조 결과 (그림 3)

아집단 내 CD63 신호(파란색 화살표 참조)
- CD63+ 아집단 : 강함
- CD63- 샘플 : 미약함(배경 수준)

차아집단 내 CD81 신호(빨간색 화살표 참조)
- CD63+/CD81+차아집단 : 탐지
- CD63+/CD81- 샘플 : 미탐지

NeutraRelease™ 이용 시 연구 확장성

고가 장비를 이용하지 않고
엑소좀 바이오마커 발굴이 가능합니다!

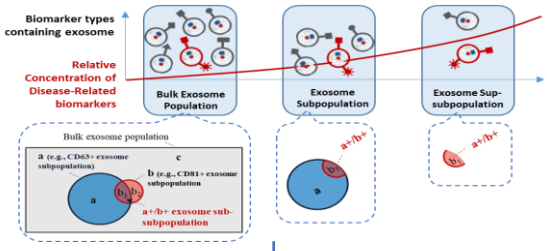
NeutraRelease™

중성 pH 등 온화한 조건하에서
엑소좀 아집단 가역적 분리

ExoBead™ *

다중 엑소좀 표면마커에 대해 **순차적인 엑소좀 차아집단 분리**

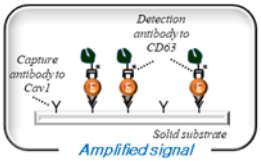
분리마커 선택 및 분리 순서에 따라 변화하는 **Exosome cargo (엑소좀 내) 분자 마커 발굴**



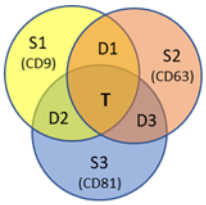
ExoMAIN™ **

차아집단 및 차차아집단 엑소좀 마커에 대한 **고감도, 심화 면역분석 (ELISA)**

탐색 지표로서 Pan-exosome tetraspanin에 상대적인 **표면 단백질 마커 mapping**



Pan-exosome tetraspanin의 **조성비 결정**



엑소좀 바이오마커 발굴

정의:

- 아집단 = 특정 단일 마커 공통 함유 엑소좀 (Single marker-positive exosome)
- 차아집단 = 특정 2중 마커 공통 함유 엑소좀 (Two markers-positive exosome)
- 차차아집단 = 특정 3중 마커 공통 함유 엑소좀 (Three markers-positive exosome)

NeutraRelease™ 특성 및 응용성 비교

면역친화 분리키트 간 응용성 안내 및 비교

	분리 후 액상 회수율	분자진단 (qPCR)		면역분석 활용성		
		아집단 수준	차아집단 수준	아집단 수준	차아집단 수준	차차아집단 수준
솔바이오 NeutraRelease™ 키트	> 90%	DNAs, RNAs	솔바이오 ExoBead™ 이용하여 2차 분리 후, DNAs, RNAs (별도 자료 제공)	WB	솔바이오 ExoMAIN™ 이용하여, ELISA (별도 자료 제공) 솔바이오 ExoBead™ 이용하여 2차 분리 후, WB (별도 자료 제공)	솔바이오 ExoMAIN™ 이용하여, ELISA (별도 자료 제공)
타사 면역비드 이용 시	< 60% (산성 pH 이용하여 회수 가능하다는 문헌 보고)	DNAs, RNAs	접근 어려움	WB	FACS	접근 어려움

용어 정의:
- WB = Western blotting
- ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay
- FACS = Fluorescence-activated cell sorting

- 아집단 = 특정 단일 마커 공통 함유 엑소좀 (Single marker-positive exosome)
- 차아집단 = 특정 2중 마커 공통 함유 엑소좀 (Two markers-positive exosome)
- 차차아집단 = 특정 3중 마커 공통 함유 엑소좀 (Three markers-positive exosome)

글로벌 기업 'I' 사 제품 대비 성능 비교

비교 항목		솔바이오 NeutraRelease™ 키트	글로벌 'I' 사 면역비드 제품	비 고
용량 및 목적 비교	키트 당 분리횟수 (각 제품설명서 기준)	10회	30회	
	제품 사용 목적	차아집단 및 차차아집단 엑소좀 3~6종 바이오마커에 대한 ELISA* (솔바이오 ExoMAIN™ 키트 이용하여 Pan-exosome 마커 분석 가능)	아집단 수준의 WB, qPCR 혹은 FACS	솔바이오 제품은 이질성 완화를 통해 바이오마커 발굴 확률이 높아지도록 특화된 제품
		아집단 및 차아집단 수준의 엑소좀 마커에 대한 WB, qPCR *,** (차아집단 엑소좀은 솔바이오 ExoBead™ 이용하여 2차 분리 필요)		

* 각 분석 프로토콜은 문의 시 제공 가능
** 분자진단(타겟: microRNAs 등)에 대한 조건 및 프로토콜은 당사에 문의 바람

엑소좀 차아집단 분리, 분석을 위한 연관 제품 안내

엑소좀 차아집단 분리용 제품

엑소좀 아집단(subpopulation) 및 차아집단(sub-subpopulations)은 대상 질환의 발병을 나타내는 바이오마커 발굴을 위한 귀중한 샘플로 사용될 수 있습니다. 그 이유는 다음과 같습니다.

- ✓ 엑소좀을 더 하부 수준으로 분리할수록 원래 샘플 내 **엑소좀의 이질성으로 인한 복잡성이 완화**될 수 있음
- ✓ 더욱이 엑소좀을 다단계로의 분리가 가능하다면, 그 **이질성은 1) 분리 수준 및 2) 분리 경로에 따라 달라질 것**으로 판단함

연구자들의 바이오마커 발굴을 돕고 함께 협력하기 위해, 현재 솔바이오㈜는 엑소좀을 다양한 아집단으로 분리 및 회수할 수 있는 NeutraRelease™ 키트를 공급하고, 나아가 회수된 엑소좀 아집단을 샘플로 이용하여 여러 차아집단으로 순차적으로 분리할 수 있도록 pan-exosome tetraspanin markers에 특이한 ExoBead™ 를 제공합니다(분리과정은 특징 3 참조).

엑소좀 **차아집단** 분리용 ExoBead™

Cat. No.	Sub C1	Sub C2	Sub C3	Sub C4
타겟 차아집단	CD9	CD63	CD81	CD151

여러 다른 엑소좀 차아집단 샘플 조제를 위한 가이드라인

아래 표에서와 같이, 솔바이오는 현 NeutraRelease™ 키트와 ExoBead™ 의 조합을 통해 9종의 다른 엑소좀 차아집단을 분리할 수 있도록 제품을 공급합니다.

2차 분리: ExoBead™ \ 1차 분리: NeutraRelease™ 키트	Sub U1	Sub U2	Sub U3	Sub U4 (준비 중)
Sub C1		CD63+/CD9+	CD81+/CD9+	CD151+/CD9+
Sub C2	CD9+/CD63+		CD81+/CD63+	CD151+/CD63+
Sub C3	CD9+/CD81+	CD63+/CD81+		CD151+/CD81+
Sub C4	CD9+/CD151+	CD63+/CD151+	CD81+/CD151+	

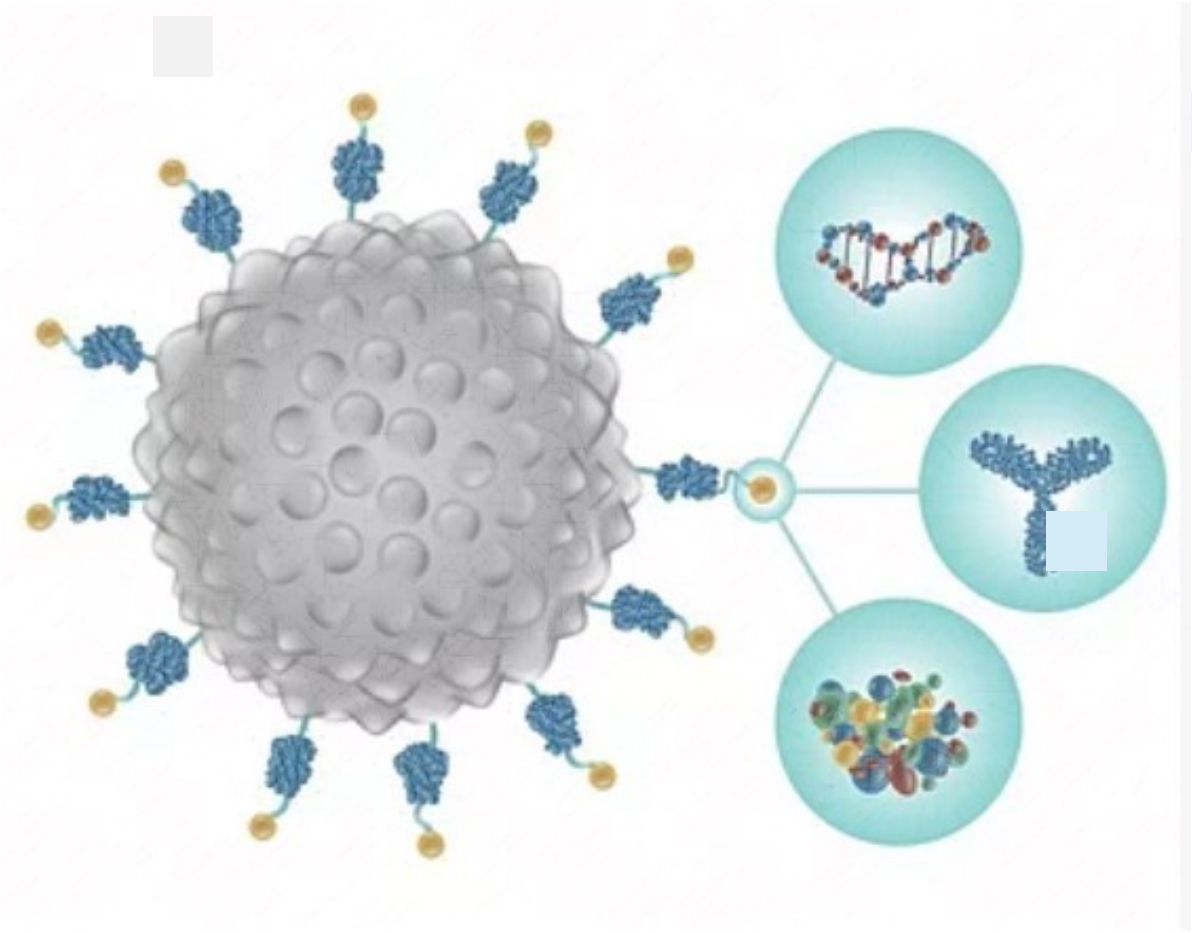
엑소좀 차아집단 마커 동시 다중 면역분석용 제품

솔바이오 NeutraRelease™ 키트를 이용하여 분리 및 회수된 엑소좀 아집단은 차아집단 마커(pan-exosome tetraspanins 등)에 대해 패널 형태로 동시 다중분석이 가능합니다. 이와 같이 아집단을 분석샘플로 이용하면, 기존 엑소좀 모집단을 이용하는 샌드위치 면역분석과 비교하여 다음과 같은 특별한 효과를 얻을 수 있습니다.

1) 아집단 샘플은 모두 공통 분리 마커를 지니므로, 이에 대한 탐지항체를 이용하여 신호 증폭
2) 샌드위치 분석 시 분리 마커와 다른 포획 및 탐지 마커를 선택하여 3중 공통 마커 함유한 차차아집단 분석
3) 상기 두 효과를 이용하여, pan-exosome tetraspanins 대비 암 등 타겟 마커에 대해 상대적 위치 mapping

엑소좀 **차아집단** 분석용 ExoMAIN™ 키트

Cat. No.	Sub M1	Sub M2	Sub M3	Sub M4
타겟 차아집단	CD9	CD63	CD81	CD151



Address

Head Office, Research Center
STE 510, 27, Seongsui-ro 7-gil, Seongdong-gu, Seoul, South Korea 04780
서울특별시 성동구 성수이로7길 27 서울숲코오롱디지털타워 2차, 510호

Development Center, GMP Facility
STE 610, 25, Seongsuil-ro 4-gil, Seongdong-gu, Seoul, South Korea 04780
서울특별시 성동구 성수일로4길 25 서울숲코오롱디지털타워 1차, 610호

전화: 02-466-2796
팩스: 02-466-2797
이메일: info@sol-bio.com
홈페이지: sol-bio.com