外泌体收集与寄送指南

|  |
| --- |
| 检测说明 |
| 样本来源 | 透射电镜 | 粒径及浓度 | 流式检测 ( 1个指标) | WB 检测 ( 1个指标) | 建议送样量 | 备注 |
| 外泌体 | 15u l | 15u l | 20u l | 20u l | 100ul | 默认外泌体浓度>10^9个/mL，根据后续实验及样本质量对样本总量要求会有差别，部分实验如 NGS 测序(20ng 总RNA)/蛋白组学 (100ug蛋白) 等建议适当加大送样量 |
| 血清/血浆 | 0.3mL | 0.3mL | 0.5mL | 0.5mL | 5ml |
| 细胞上清 | 1mL | 1mL | 2mL | 5mL | 20ml |
| 尿液 | 5mL | 5mL | 10mL | 25mL | 50ml |
| 唾液 | 2ml | 2ml | 4ml | 8ml | 15ml |
| 鼻涕 | 2ml | 2ml | 4ml | 8ml | 15ml |
| 脑脊液 | 1.5ml | 1.5ml | 3ml | 6ml | 10ml |
| 羊水 | 2ml | 2ml | 4ml | 8ml | 15ml |
| 精液 | 0.3mL | 0.3mL | 0.5mL | 0.5mL | 5ml |
| 胆汁 | 0.3mL | 0.3mL | 0.5mL | 0.5mL | 5ml |
| 腹水 | 2mL | 2mL | 5mL | 15mL | 30ml |
| 乳液 | 2ml | 2ml | 4ml | 8ml | 15ml |
| 卵泡液 | 2mL | 2mL | 4mL | 8mL | 15ml |

|  |
| --- |
| 样品收集细节 |

|  |  |
| --- | --- |
| 血浆样品 (不能用肝素抗凝) | (1) 用采血针和 EDTA 抗凝管抽取全血，轻柔上下颠倒混匀后室 温或者 4°C 保存，并在 1 小时内进行下一步处理；(2) 4°C 条件下，使用吊桶式转头 1900 g 离心 10 min，小心 吸取上清即为血浆，最后 500 μ l 左右丢弃。得到的血浆再次 离心，条件为 4°C，3000 g，15 min，小心吸出血浆，注意不 要碰到底部和侧面的沉淀物；(3) 将血浆冻存于-80°C；提示：送样量最好 4 ml 以上 (分离 4 ml 血浆约需要 8-10 ml 全血) 。 |
| 血清样品(有条件的话尽量采用血浆 ，避免血小板来源的外泌体影响) | (1) 用采血针和普通血清管 (不含任何试剂，10ml规格) 采血10 ml；(2) 室温静置 30 min，然后 4°C 条件下，静置 3-4 小时 (此 时可见血块析出) ；(3) 用移液器吸取上面的淡黄色血清 (应该有 4 ml左右) 转入15 ml 离心管中，4°C 条件下 3000g 离心 15min，小心取上清 转入新的 15 ml 离心管中，最大程度保证血清质量；(4) 离心后的血清 15 分钟内冻存于-80°C 冰箱；提示：送样量最好 4 ml 以上 (分离 4 ml 血清约需要 10-15ml 全血) 。 |
| 细胞上清(需采用去除外泌体的 培养基) | (1) 细胞在正常含有血清的培养基中培养一定时间，贴壁细胞 密度在 70 %-80 %，悬浮细胞密度在 60 %-70 %；(2) 对于贴壁细胞，去除原有培养基，换为新的不含外泌体的 培养基或者无血清培养基；对于悬浮细胞，300 g，4°C，10 min 收集细胞；(3) 使用不含外泌体的培养基或者无血清培养基悬浮细胞并继 续培养。细胞继续培养 24-48 小时，根据细胞的生长速度确定 收取上清时间；(4) 收集细胞上清，300 g，4°C，离心 10 min；小心吸取上清， 注意避免吸入细胞或者细胞碎片；(5) 3000 g，4°C，再次离心 15 min，确保将细胞或者细胞碎 片去除干净；(6) 取上清，注意避免吸入细胞或者细胞碎片，合并相同的细 胞培养液上清样品，装入无菌的玻璃瓶，可在 4°C 短期保存(1-2 天) ，长期保存可冻存于-80°C 。建议细胞上清分离后尽快进 行外泌体分离，保存在 4°C 和-80°C，都会对产量有一定的影 响。 |
| 尿液 | (1) 采集前/中后段晨尿，应该尽量选择受试者的“新鲜”尿液 100ml，并注意避免细菌污染，收集前注意对饮食的控制，于 4℃ 临时保存 (不得超过 8 h) ；(2) 并于 3000×g 离心 15min，去除细胞或细胞碎片；(3) -80℃冰箱中保存。 |
| 脑脊液 | (1) 收集脑脊液 10ml，采集方式为腰椎穿刺，样本一经分离， 请务必立即置于冰上或4℃短暂保存 (不得超过 4 h) ,避免受到血液污染,勿使用含肝素抗凝剂的采样管收集盛放；(2) 并于 3000×g 离心 15min，去除细胞或细胞碎片；(3) -80℃冰箱中保存。 |
| 胸水 | (1) 临床收集胸水后若不能第一时间处理，请于4℃临时保存 (不得超过 8 h) ；(2) 将收集到的胸水 1000 g 离心 10 min，收集上清液；(3) 将得到的胸水上清 3000 g 离心 10 min，收集上清；(4) -80℃冰箱中保存。 |
| 腹水 | (1) 临床收集腹水后若不能第一时间处理，请于4℃临时保存 (不得超过 8 h) ；(2) 将采集到的腹水在 4℃下 (室温亦可) 离心 2000 g，20 min， 去除腹水中的残渣；(3) -80℃冰箱中保存。 |
| 胆汁 | (1) 用无菌容器收集胆汁；(2) 将收集到的胆汁在 4℃下，3000 g 离心 10 min 去除细胞沉 渣和碎片；(3) 收集胆汁上清液，4℃或者-20℃长期保存。 |

注意事项：

● 采集的样本需要符合纳入标准：如年龄、肥胖 (身高、体重) 、血糖血脂血压、诊断情况 等。

● 统一早晨空腹采血，尽量避免样本间的差异影响。

● 如个别样本发生溶血，则弃掉。

● 样本编号用油性笔清楚地写在管壁及管盖上。

● 离心管在放入冰箱前，用封 口膜密封。

● 如果提供的是冻存细胞株，需提供详尽的复苏方法。

● 细胞培养基必须使用去除 exosome (de-exosome) 的血清或者无血清培养基(例如 Thermo Fisher 的 SFM)。

● 分离外泌体前的样品不能加入任何 RNA 保护剂 (如 Trizol)。

● 分离好的外泌体如需进行电镜观察，需要放 4°C 保存，并且不宜保存太久。

● 全血建议使用 PAXgene 管保存，不可冻融，取血后尽早制备血浆或血清，血浆或血清可 以-80°C 保存，但应避免反复冻融。

● 储存条件以及储存时间影响外泌体得率，保存在-80℃冰箱中的样本，如果储存时间过长， 外泌体产量也会显著降低。

● 干冰运输应采用壁厚且质量完好的泡沫箱，24 小时到达的，干冰数量不得低于 5 公斤；

48 小时到达的，干冰数量不得低于8 公斤；夏季适当增加干冰 (1.5 倍)。

常见实验问题：

1.血浆 (plasma) 还是血清(serum)？

对于大多数涉及到 Exosome RNA 分离的研究，我们推荐使用血浆 (plasma) 。 因为血清收集 后在凝血过程中，血小板受到刺激会产生许多 Exosome 和其他形式的小泡，因此血清中获得 的小泡始终比血浆中多，甚至超过 50%的小泡来源于血小板。所以血浆是研究病理生理状态 下 Exosome 更好的介质。多数的 criculating Exosome 研究样本使用的是血浆。负压采血之 后，血液首先存放入采血管，去除止血带，最初的几毫升不要，因为有压力激活效应，并且 被成纤维细胞污染。血液收集应该轻柔并且迅速。颠倒混匀采血管 8-10 次，与管壁上的抗 凝剂混合，但不要为了抗凝而剧烈摇动。离心前管子应该垂直存放，并记录实验室中存放的 时间，因为从采血到离心除去细胞和血小板这中间的过程很重要，建议在30min 内完成，长 时间的存放，而没有及时处理会导致血小板细胞Exosome 的进一步释放。血液要尽快处理， 在室温条件下分离血浆 (或者血清) 。所有样品要使用相同的转速和转子类型离心。

2.怎样选择抗凝剂 (anticoagulant) ？

抗凝剂有一个或多个形式的功能,包括螯合钙、蛋白酶抑制和抑制血小板活化。有许多抗凝 血剂可用，但不建议使用肝素 (heparin) 抗凝剂。无论是外源性或内源性起源 (例如肥大 细胞)，肝素会抑制下游 PCR 反应，因为肝素会与引物和酶竞争与核酸结合。另外,肝素可抑 制 Exosome 与靶细胞的结合,抑制 Exosome 激活血小板或降低血小板激活阈值。应用肝素治 疗的病人也应该注意。 对于珍贵样本，可能需要从肝素化的血液样品中提取 RNA。核酸的 检测需要通过调整 PCR 的敏感性。另外如果 Exosome 相关核酸被发现只存在于 Exosome 内, 在 RNA 分离之前的洗涤也可以帮助去除肝素。其它抗凝剂如 EDTA、氟化钠/草酸钾(NaF/KOx), 或柠檬酸三钠[加入/不加右旋糖 dextrose(ACD)或茶碱(theophyll ine)、腺苷(adenosine) 和双嘧达莫(CTAD)]就更复杂了，最好根据下游的实验来指导。CTAD 阻碍血小板活化和随后 的 Exosome 释放。EDTA 可干扰 PCR 反应(尽管程度低于肝素),但它的存在可能是无害的。另 外,下游实验的选择需要考虑到抗凝剂的使用种类。不同的聚合酶对抑制剂有不同的敏感性。

3.静脉取血过程应该注意什么?

在血液处理过程中，由于物理作用力，血小板中的Exosome 容易在处理过程中释放，这些外 力包括：接触、压力、剪切力，所以标准化的样品处理，需要统一的注射器型号以及其他操 作。使用 21 号针头或者更大号的针头可以避免静脉取血剪切力引起的不良效应。 负压采血 之后，血液首先存放入采血管，去除止血带，最初的几毫升不要，因为有压力激活效应，并 且被成纤维细胞污染。血液收集应该轻柔并且迅速颠倒混匀采血管 8-10 次，与管壁上的抗 凝剂混合，但不要为了抗凝而剧烈摇动。

4.样本受昼夜节律，采血时间和饮食状态的影响吗？

血液学参数在人体的一天之中是有变化的，血液粘稠度的轻微变化在几十年前就已发现。最 近发现，昼夜节律对于血小板的激活具有很大的影响，而且比压力 (包括锻炼身体) 的影响 还要大。 白细胞穿梭以及在促炎症因子和抗炎症因子在血液循环中存在也在一天当中有变 化。因此，对于Exosome 的研究，在实验设计上，需要有严格的对照，采血时间在昼夜节律 上的一致才能更容易的比较样本差异。此外，还需要考虑，样本来源人体在正常睡眠/苏醒 周期上的差异性。食物对于 Exosome 的影响目前还不知道，但是因为脂蛋白载着 RNA，食物 的吸收影响血液循环中脂蛋白颗粒的类型、数量和功能，因此采血可以在饭后一个统一的时 间点进行，进食记录也是很有价值的。

5.还需要额外的数据收集吗?

来自血液其他数据对于分析病理生理作用也是很有意义的，有时可能还需要分离其它细胞如 白细胞或者血清游离DNA/RNA 作为 Exosome 的对照，有时需要流式细胞术配合抗体对细胞分 选或分析，确定血液细胞组分的比例。血中 Exosome 可能来自其他组织器官，有时需要从同 一个患者身上得到多种体液与血液进行对比，例如脑脊液(CSF)和血浆样本。

6.溶血是否影响结果？

一般溶血样本通过颜色就可以看出来，如果必要可通过分光光度计和血红蛋白释放实验测量。 当分析总 exRNA，溶血的血液制品含有高浓度的特定 RNA，其中包括 miR-16 和 miR-451 等， 还有待确定 RNA 以这种方式释放是否会干扰 exRNA 分析结果。

7.血液样本需要记录哪些信息？

国际细胞外囊泡学会(International Society for Extracellu lar Vesicles, ISEV)推荐记 录如下信息：

采血时间

采血针的类型/其他配件

抗凝管的类型

起始弃去的血液有多少？止血带是否移除迅速？

采血时间和离心时间间隔有多久？

处理注意事项 (样本是否保持垂直？是否室温存放？)

是否溶血和检测方法？

样本处理细节 (转子类型、离心力、离心时间)

样本分装细节和存放

细胞是否分离？

全血计数？

流式检测？

是否还进行其他血液检测？

是否有匹配的其他样本收集 (比如血浆和血清，尿液，鼻液， 口水等)

是否有病人亲属样本作为对照

常见样本问题:

1、分离方法适用于哪些种类样品中的外泌体提取？

可用于细胞上清液、血清、血浆、尿液及其他低密度体液 (如脑脊液、腹水、羊水、乳汁、 唾液等) 的外泌体提取。

2、样品在提取外泌体之前是否可以低温保存？

可以。血样、尿样、体液等，需要攒齐了一起提取，或者同一个患者的样本多次提取。冻存 前，首先要离心去除细胞和血小板，再将样品分装冻存于-20 或-80℃ 。但如果有条件最好 还是用新鲜样品立即进行提取。长期请保存于-80℃ ，无须加冻存液；短期 (1-2 天内) 则 保存于 4℃即可。

3、外泌体提取后是否可以冻存？

可以。使用硅化 E.P.管或冻存管，减少 exosome 的粘附。Exosome 能够承受反复冻融，建议 分装，避免多次反复冻融。对于一些功能性实验，建议不要冻存，直接使用新鲜提取或保存 在 4℃悬浮于 PBS 中的 exosome。4℃保存不超过一周，-80℃条件下可长期保存。

4、需要从血浆中分离外泌体，可以使用肝素或EDTA 管去收集血液样本吗？

不可以。肝素将会大大损害接下来的RNA 实验。EDTA 也许会干扰 PCR 实验。使用无肝素无 EDTA 管去收集血液样本。立即离心样品收集血浆用于exosome 分离。如果必须使用抗凝剂， 用 EDTA 管收集血液。如果有必要的话在接下来的 PCR 反应中调整 Mg++的浓度。采血管的选 择：血浆 (plasma)：紫盖采血管；血清 (serum)：黄盖采血管 (促凝管或促凝管带分离胶)。

5、粘度过大的样品如何处理？

如果样品粘度过大时(因细胞分泌物较多所致)，可将样品用 1 ×PBS 缓冲液进行等体积稀释。

6、培养细胞时，如何去除血清来源的外泌体？

多数情况下，细胞在体外培时养需要血清，而血清中一般都含有外泌体，为避免血清对细胞 外泌体的污染，可采用以下两种方法：

(1) 将细胞培养用的血清通过 1 ×105g 超速离心 10h 以去除血清外泌体；

(2) 选择无血清培养基进行细胞培养。

7、无外泌体血清培养基 (或者无血清培养基) 在什么时候使用？

细胞在正常含血清的培养基中培养一定的时间后，细胞融合度约为60%-70%时，移去原有含 血清的培养基，换成新鲜的无外泌体血清培养基 (或者无血清培养基) ，继续培养 24-48h， 细胞融合度达到80%-95%左右时收取上清,该上清液即可用于提取外泌体。

8、细胞培养过程中的死细胞是否会影响外泌体的提取？

会的。在收获细胞时，应确定死亡细胞占比不超过5%。细胞凋亡/死亡过程中会释放大量大 小不等的囊泡，它们在外泌体的提取纯化过程中会污染活细胞产生的外泌体。

9、如何鉴定提取的外泌体？

通常使用透射电镜检测 (形态) 、粒径检测 (大小) 、Western blot 检测等方法鉴定提取的 外泌体。在进行 Western blot 检测时，通常检测外泌体标志蛋白 (CD63、CD9、CD81、TSG101 等) ，按照国际细胞外囊泡协会的建议为检测2 个阳性和 1 个阴性指标。

10、准备做细胞外泌体 Small RNA 的 NGS 测序，初始样品量需要准备多少？

普通肿瘤细胞系推荐使用40mL 以上的初始样品量。由于某些细胞 (如悬浮细胞、干细胞、 神经细胞等) 中外泌体含量比较低，建议先通过 10kD 超滤柱浓缩，准备40mL 以上的浓缩液 再进行超速离心分离外泌体，一般需提取到20ng 以上的 Total RNA。

11、进行外泌体 RNA RT-PCR 实验推荐什么内参？

取决于具体样品，可以选择外源添加 cel-miR-39-3p，或内源 U6、SNORD61、SNORD68、SNORD72 作为内参。

12、提取的外泌体进行Western b lot 前是否需要加入 RIPA 试剂裂解？

需要，一般按照 1:1 的比例加入 RIPA 试剂。

13、进行外泌体Western blot 鉴定时有无内参蛋白可供选择？

无，该检测属于定性检测。

14、组织细胞外泌体如何提取？

无菌环境下将组织剪成小块 (越小越好) ，然后在无血清的培养基中培养 12h；将培养液转 移至离心管中，于 4℃以3000g 离心 20 min 去除培养液中杂质和细胞碎片，将上清液转移 至新的离心管中；先使用 0.45μm 滤器过滤上清液，接着使用 0.2μm 滤器过滤上清液，再 进行超速离心分离外泌体。有条件的话建议采用Transwell 小室培养的方式，效果更佳。