

样本外泌体分离及电镜、粒径、WB 检测、RNA 提取实验报告

项目名称：样本外泌体分离及电镜、粒径、WB 检测、RNA 提取

项目编号：XXXXXXXX

报告性质：总结性报告

报告时间：

外泌体标准化服务平台

1. 外泌体简介

外泌体（Exosomes）产生于细胞中的多泡体，是活细胞分泌的直径约为30~150 nm的膜性囊泡，密度为1.13-1.19 g/ml，有典型的“杯盘”形态。人体中几乎所有类型的细胞均能产生外泌体，近乎于平均每个人体细胞产生1000-10000个。通常1ml血液中存在 1×10^{12} 个外泌体。外泌体具有异质性，即使是同一种细胞分泌的外泌体都有可能具有很大功能区别。外泌体几乎存在于所有的组织、细胞间隙、体液中，包括血液、唾液、尿液和母乳。外泌体携带了参与细胞内信号转导的蛋白、miRNA、lncRNA、circRNA、mRNA 以及其降解片段，参与细胞活动的重要调控；在肿瘤转移、免疫调控机制、疾病发生发展、阿兹海默症和免疫疾病等疑难杂症的治疗方面崭露头角，有望成为多种疾病的早期诊断标志物。

外泌体的分离方法主要有：差速离心、密度梯度离心、体积排阻色谱法、过滤法、聚合物沉淀法、免疫分离、隔离筛选法等。但是CNS上外泌体研究的文献中主流的分离方法目前还是超速离心的方法。超速离心分离可以准确地重复获取外泌体，同时最大限度减少蛋白质聚集体和其他膜粒子的共纯化。

目前我司对于外泌体的鉴定方法主要有：透射电子显微镜（TEM）、粒径分析（NTA 或 NanoFCM）、蛋白指标检测（Western Blot 或 NanoFCM）。

2. 实验目的

采用超速离心法提取外泌体，并对提取的外泌体进行电镜、粒径、WB检测、纳米流式荧光检测、RNA提取及Qsep100检测。

3. 材料与仪器

3.1 样本情况

1例样本（客户提供）。

样本名称	原始样本体积（mL）	剩余外泌体体积（ μ L）
EXO	2	/

外泌体标准化服务平台

3.2 主要试剂与仪器

名称	品牌	货号
PBS	Sangon Biotech	E607008
0.45 μm 过滤膜	Millipore	R6BA09493
CD9	Abcam	ab92726
CD63	Abclonal	A5271
CD81	Abcam	ab109201
TSG101	Abcam	ab125011
Calnexin	Abcam	ab22595
FITC Mouse IgG	BioLegend	400108
FITC Mouse Anti-Human CD9	BD	555371
FITC Mouse Anti-Human CD81	BD	551108
miRNeasy Mini kit	Qiagen	217004
名称	品牌	型号
移液器	Eppendorf	Research Plus
小型冷冻离心机	Beckman	Microfuge 20R
超低温冰箱	Thermo	905
超速离心机	Hitachi	CP100MX
透射电镜	Hitachi	HT-7700
粒径分析仪	NanoFCM	N30E
多功能酶标仪	Thermo	Varioskan LUX
化学发光凝胶成像系统	CLINX	ChemiScope 3000mini
核酸测定仪	Promega	Quantus Fluorometer
全自动毛细管电泳核酸分析仪	BIOptic	Qsep100

4. 实验方法

4.1 超速离心法提取外泌体

- 1 在 37 °C 中速融样本。
- 2 将样本移动至一个新的离心管内，2000 \times g，4 °C，30 min 离心。

外泌体标准化服务平台

- 3 小心的将上清液移至新的离心管中， $10,000 \times g$ ， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， 45 min 再次离心，以去除较大的囊泡。
- 4 取上清，经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤，收集过滤液。
- 5 将过滤液移至新的离心管中，选择超速转子， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $100,000 \times g$ 离心 70 min 。
- 6 去除上清，用 10 mL 预冷的 $1\times\text{PBS}$ 重悬后，选择超速转子，再次 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $100,000 \times g$ ，超速离心 70 min 。
- 7 去除上清，用 $100\text{ }\mu\text{L}$ 预冷的 $1\times\text{PBS}$ 重悬，取 $5\text{ }\mu\text{L}$ 电镜， $5\text{ }\mu\text{L}$ 粒径， $50\text{ }\mu\text{L}$ 提蛋白， $20\text{ }\mu\text{L}$ 荧光， $20\text{ }\mu\text{L}$ 加入 $700\text{ }\mu\text{L}$ 裂解液提 RNA。

4.2 外泌体样品透射电镜观察

- 1 将外泌体取出 $5\text{ }\mu\text{L}$ 稀释到 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。
- 2 吸取样品 $10\text{ }\mu\text{L}$ 滴加于铜网上沉淀 1 min ，滤纸吸去浮液。
- 3 醋酸双氧铀 $10\text{ }\mu\text{L}$ 滴加于铜网上沉淀 1 min ，滤纸吸去浮液。
- 4 常温干燥数分钟。
- 5 100 kv 进行电镜检测成像。
- 6 获得透射电镜成像结果。

4.3 外泌体样品粒径分析

- 1 将外泌体取出 $5\text{ }\mu\text{L}$ 稀释到 $30\text{ }\mu\text{L}$ 。
- 2 先用标准品进行仪器性能测试合格后方可进行外泌体样品上样，注意需进行梯度稀释避免样本堵塞进样针。
- 3 待样本完成检测即可获得仪器检测外泌体的粒径和浓度信息。

4.4 外泌体样品蛋白提取及浓度测定

- 1 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中速融外泌体，并迅速加入 $6\times$ 的 RIPA 裂解液。
-

外泌体标准化服务平台

- 2 混匀后在冰上裂解 30 min，期间混匀。
- 3 配制 BCA 法测蛋白浓度的标准样品，并取 5 μL 样品加入到 BCA 混合液中，混匀。
- 4 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min，酶标仪上在 OD562 nm 处检测吸光值并记录。
- 5 根据标准曲线算出待测样品蛋白浓度。

4.5 外泌体样品 WB 蛋白指标检测

- 1 根据待检测样品蛋白大小配制浓度为 10 % 或 15 % 的 SDS PAGE 电泳胶；将电泳装置装好后，加入适量 Running Buffer。
 - 2 取出蛋白样品，恒温金属浴上煮 3 ~ 5 min，离心甩下；将蛋白样品以及蛋白 Maker 按所需顺序用移液器或上样针加入到电泳胶上的孔内。
 - 3 盖上槽盖，打开电源，80 V 跑胶至样品跑出浓缩胶，转 100 V 跑胶至溴酚蓝至胶底部。
 - 4 电泳完毕后取出电泳胶，修整胶的大小，切去边缘与多余的部分，左下角切角标记；根据修整后胶的尺寸，裁剪相应大小的 PVDF 膜，在左下角剪角做标记，在适量甲醇中活化 20 s，然后浸泡于预冷的转膜缓冲液中。
 - 5 取 8 张滤纸切成 8 cm \times 10 cm 的尺寸，同样浸泡在预冷的转膜缓冲液中；按照海绵-滤纸-电泳胶-膜-滤纸-海绵的顺序制作转膜“三明治”。
 - 6 将转膜缓冲液加入槽中，组装好转膜装置，加入浮冰，将装置埋于冰浴或置于冰箱，打开电源，300 mA 转膜，转膜时间依据需检测蛋白的大小确定，一般规则为 1 kd = 1 min。
 - 7 转膜完毕后取出 PVDF 膜，将膜按蛋白面朝上浸泡于 5 % 脱脂牛奶 TBST 中，封闭 1 h。
 - 8 一抗封闭：牛奶封闭后的膜按需裁剪，将膜浸泡于配制好的一抗溶液（抗体稀释比例均为 1：1000）中，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。
 - 9 回收一抗，用 20 mL TBST 在室温下洗膜 10 min，重复三次。
-

外泌体标准化服务平台

10 根据一抗选择二抗，将二抗按 1:5000 配在 5 % 脱脂牛奶 TBST 溶液中，将膜浸泡在二抗溶液中，室温孵育 1 h 左右。

11 回收二抗，用 20 mL TBST 在室温下洗膜 10 min，重复三次。

12 取出 PVDF 膜，沥干水分，蛋白面朝上平铺于保鲜膜上，将等体积混合的 ECL A/B 液混合液滴加到膜上避光反应 5 min；将膜夹起移入塑封膜中，蛋白面始终朝上。

13 将膜放在成像仪中，设置好参数，开始曝光；调整好亮度和对比度，保存图片。

4.6 外泌体样品荧光标记及纳米流式检测

1 将 20 μ L 外泌体稀释至 90 μ L，取 30 μ L 稀释外泌体分别加入 20 μ L 荧光标记的抗体（CD9、CD81、IgG），混匀，避光 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

2 加入 1 mL 预冷的 PBS，选择超速转子，4 $^{\circ}$ C，110,000 \times g，超速离心 70 min。

3 小心去除上清，加入 1 mL 预冷的 PBS，选择超速转子，再次 4 $^{\circ}$ C，110,000 \times g，超速离心 70 min。

4 小心去除上清，用 50 μ L 预冷的 1 \times PBS 重悬。

5 先用标准品进行仪器性能测试合格后方可进行外泌体样品上样，注意需进行梯度稀释避免样本堵塞进样针。

6 待样本完成检测即可获得仪器检测蛋白指标结果。

4.7 外泌体样品 RNA 提取及浓度测定

4.7.1 RNA 提取

1 RNA 裂解液解冻后，室温放置 5 min。。

2 添加 140 μ L 氯仿，涡旋混匀 15 s。

3 室温孵育 3 min，4 $^{\circ}$ C、12000 g、离心 15 min（提前预冷离心机，该步结束后

外泌体标准化服务平台

立即恢复室温)。

- 4 将上层水相转移至一新的 EP 管中（避免吸到中间层），加入 1.5 倍体积的无水乙醇（通常体积为 525 μL ），枪吸混匀。
- 5 吸取 700 μL 混合液（包括所有沉淀），转移至 RNeasy 吸附柱中，室温下 8000 g 离心 15 s，弃滤液（重复使用收集管，下同），剩余混合液重复该步骤。
- 6 添加 700 μL Buffer RWT 洗涤吸附柱，室温下 8000 g 离心 15 s，弃滤液。
- 7 添加 500 μL Buffer RPE 洗涤吸附柱，室温下 8000 g 离心 15 s，弃滤液。
- 8 添加 500 μL Buffer RPE 洗涤吸附柱，室温下 8000 g 离心 2 min，弃滤液和收集管（小心取出柱子，避免触碰滤液，残留酒精）。
- 9 将吸附柱转移至新的 2 mL 新离心管（自备）中，12000 g 离心 1 min 进行干燥，弃滤液和收集管。
- 10 将吸附柱转移至 1.5 mL 新离心管，添加 30 μL RNase-free water 到吸附膜中间，8000 g 离心 1 min，洗脱 RNA。
- 11 立即转移至 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存，并登记样本信息。

4.7.2 RNA 浓度测定

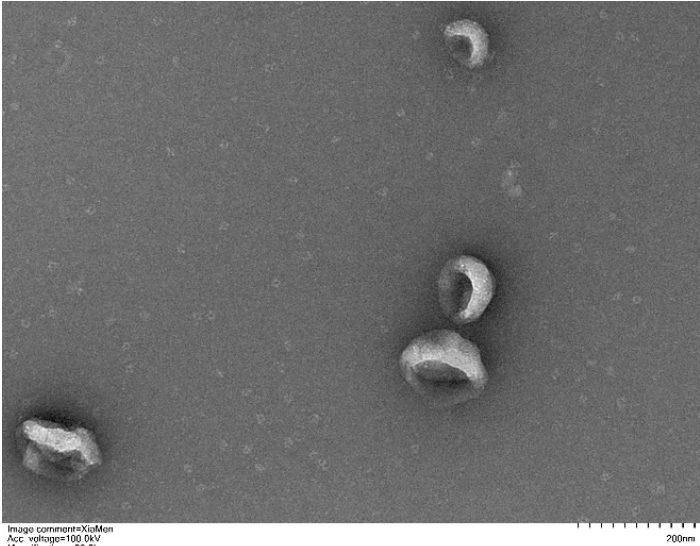
将提取好的 RNA 各取出 1 μL 进行染色，并在 Quantus Fluorometer 上测定 RNA 浓度。

4.8 外泌体 RNA Qsep100 检测

根据 RNA 浓度，取适量 RNA 原液用 NR1 卡夹配套稀释液进行稀释，稀释后上机检测。

5. 实验结果

5.1 外泌体电镜图

样本名称	电镜图
EXO	

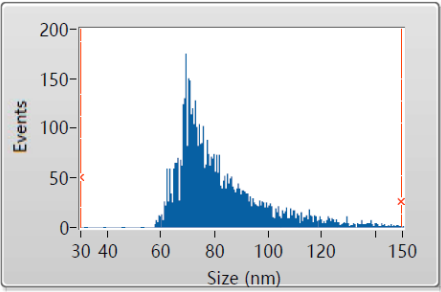
注：更多电镜图详见原始数据

5.2 外泌体粒径分析结果

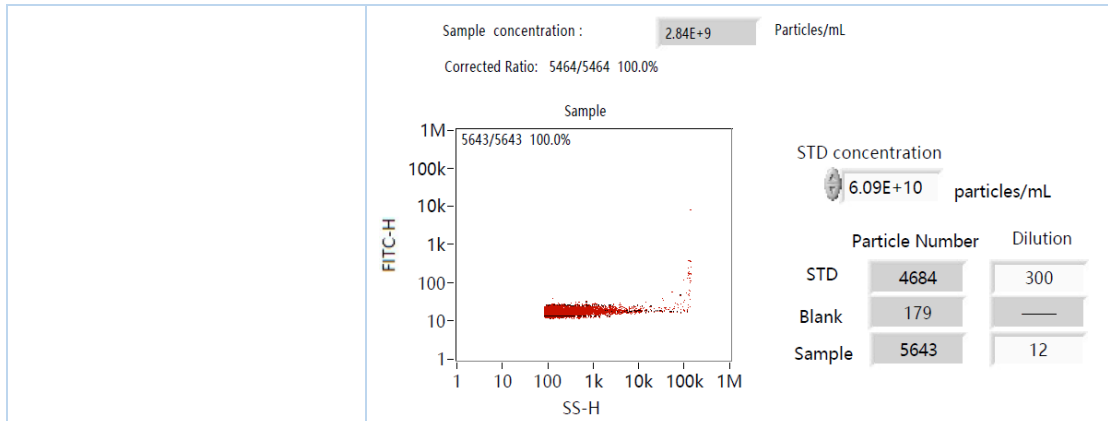
样本名称	平均粒径 (nm)	浓度 (Particles/mL)
EXO	81.97	2.84E+9

注：粒径分布详见原始数据

粒径示意图：

样本名称	粒径及浓度示意图												
EXO	 <table border="1" data-bbox="1098 1608 1337 1859"> <tr> <td>Total Events</td> <td>5464</td> </tr> <tr> <td>Gating Events</td> <td>5336</td> </tr> <tr> <td>% of all</td> <td>97.66</td> </tr> <tr> <td>Median</td> <td>76.75 nm</td> </tr> <tr> <td>Mean</td> <td>81.97 nm</td> </tr> <tr> <td>Std Dev.</td> <td>16.61 nm</td> </tr> </table>	Total Events	5464	Gating Events	5336	% of all	97.66	Median	76.75 nm	Mean	81.97 nm	Std Dev.	16.61 nm
Total Events	5464												
Gating Events	5336												
% of all	97.66												
Median	76.75 nm												
Mean	81.97 nm												
Std Dev.	16.61 nm												

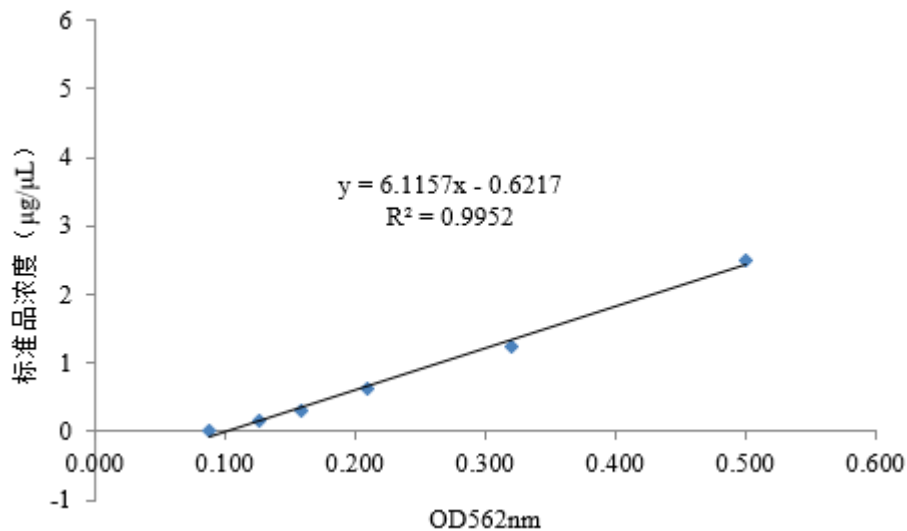
外泌体标准化服务平台



5.3 外泌体蛋白指标检测结果

1. BCA 测定外泌体蛋白浓度:

标准曲线:

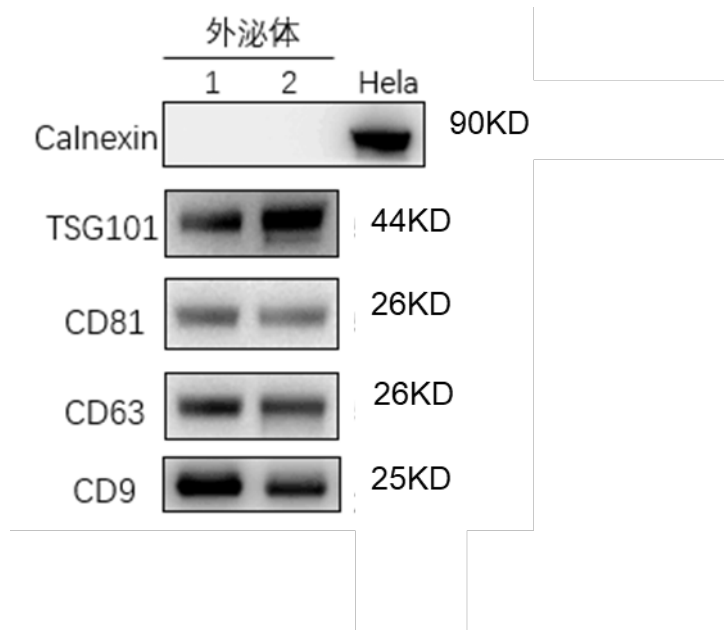


将外泌体蛋白测出的 OD562 分别带入到以上公式进行计算，提取得到的外泌体蛋白浓度及总质量见下表:

样本名称	光密度 (OD562nm)	蛋白浓度 (µg/µL)	蛋白裂解液体积 (µL)	蛋白总量 (µg)
EXO	0.161	0.36	35	12.72

外泌体标准化服务平台

2. WB 检测外泌体蛋白表达:

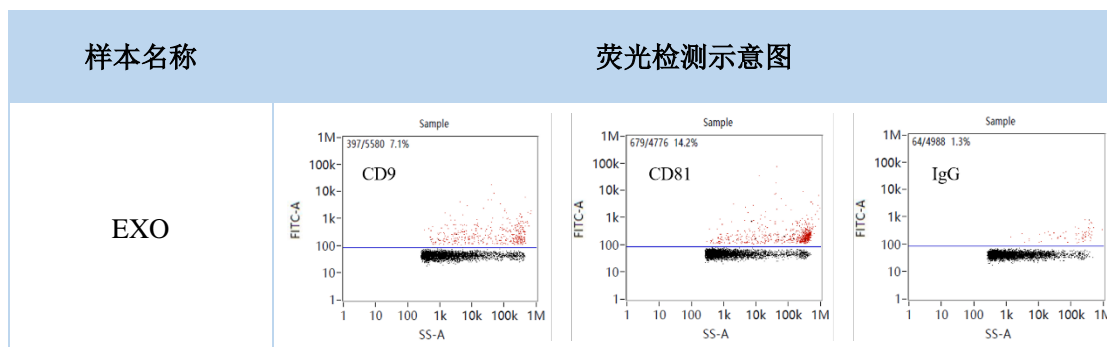


5.4 纳米流式检测外泌体表面蛋白表达

外泌体表面蛋白表达阳性率:

样本名称	外泌体表面蛋白表达阳性率 (%)		同型抗体对照 (%)
	CD9	CD81	FITC-IgG
EXO	7.1	14.2	1.3

荧光检测示意图:

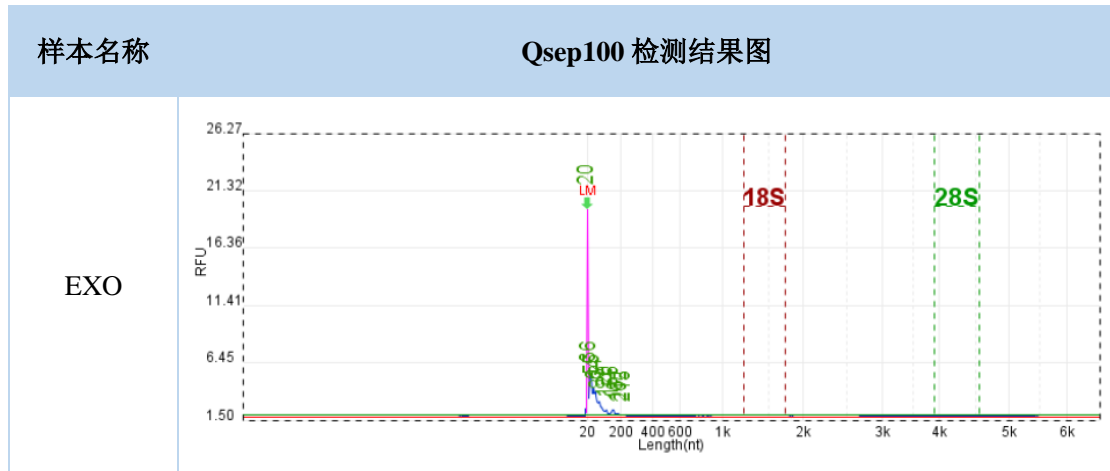


5.5 外泌体 RNA 浓度测定结果

样本名称	RNA 浓度 (ng/ μ L)	RNA 总量 (ng)
EXO	1.5	24

外泌体标准化服务平台

5.6 外泌体 RNA Qsep100 检测结果



5.7 外泌体质量评估参考标准

质量参数		参考标准 ¹
电镜质量评估	外形	形态完整、球形、大小均一
	放大倍数	1 μm、500 nm、200 nm、100 nm
粒径质量评估	颗粒浓度	10 ⁷ ~ 10 ¹¹ Particles/mL
	粒径大小	30 ~ 200 nm
蛋白质质量评估	阳性指标结果 ²	CD9、CD63、CD81、TSG101 有条带
	阴性指标结果 ³	Calnexin 无条带

注：

- 1.参考标准数值为实验室处理大量样本后所统计的平均水平，存在合格样本结果与该数值不符的情况；
- 2.虽然阳性指标为文献报道较多的外泌体标志性蛋白，但个别指标由于蛋白浓度较低或抗体免疫分型等原因可能存在无明显条带的情况；
- 3.默认设置细胞裂解液作为阳性对照品，以验证 Western Blot 实验操作规范性，应尽量避免样本在前处理或冻存运输等步骤引入细胞碎片污染而导致阳性结果。