
外泌体样本制备和运输指南

● 转录组测序平台

- 全转录组测序
- small RNA 测序

● 外泌体分离+鉴定

- 纳米颗粒跟踪分析 (NTA)
- 外泌体标志物蛋白鉴定 Western Blot
- 透射电子显微镜 (Transmission electron microscope, TEM)

● 物种范围

- 样本类型：血浆、血清、细胞上清、脑脊液、尿液、腹水等。
- 人 / 大鼠 / 小鼠

● 样本要求 (分离外泌体)

- 血浆：1-4mL (最低 1mL)
- 血清：1-4mL (最低 1mL)
- 细胞上清：20-50mL (最低 10mL)
- 脑脊液：5-10mL
- 尿液：50-80mL
- 离心或过滤去除细胞，细胞碎片 凋亡小体

测序

small RNA seq /全转录组测序

外泌体是指包含了复杂 RNA 和蛋白质的小膜泡(30-150nm)，人体内多种细胞及体液均可分泌外泌体，包括内皮细胞、免疫细胞、血小板、平滑肌细胞等。当其由宿主细胞被分泌到受体细胞中时，外泌体可通过其携带的蛋白质、核酸、脂类等来调节受体细胞的生物学活性。外泌体 RNA 特点：25-200nt，以 small RNA 为主，含少量 rRNA/lncRNA/circRNA。

送样建议 (体液样本): 根据要求运输，到公司后分离外泌体。

送样建议 (外泌体): 重悬于适当体积的 PBS 中，-80°C 保存、干冰运输。

送样建议 (Exosomal RNA): 可溶于无核酸酶水中，-80°C 保存、干冰运输。

血浆：

血清血浆 1mL，预过滤的血浆（不包含大于 0.8 μm 的微粒）

1.通过 BD Vacutainer® Venous Blood Collection Tubes (cat. no.367525) EDTA 抗凝管采集全血。避免使用肝素抗凝管，肝素会影响 PCR 酶活，抑制下游 PCR 反应。

2.在 4°C 条件下 1900xg 离心 10min 后，移取黄色上清液到新的离心管中；

3.收集的上清液，需在 4°C 条件下 3000xg 离心 15min（或用 0.8μm 滤膜过滤），去除细胞、细胞碎片、凋亡小体等。

4.转移上清液到新的离心管中，2-8°C 短时存放。长期保存选择-80°C 条件。

注意：血浆收集后，1 mL 每管分装，避免冻融。存放于-80°C，干冰运输。

血清：

- 1.通过不含抗凝剂的采血管采集全血，静置等待凝血（含促凝剂的采集管室温放置约 10min 后发生凝血）
- 2.在 4°C 条件下 1900xg 离心 10min 后，移取黄色上清液到新的离心管中（一般情况下，10mL 全血可收集 3-5mL 血清）；
- 3.收集的上清液，需在 4°C 条件下 3000xg 离心 15min（或用 0.8 μ m 滤膜过滤），去除细胞碎片来源的游离核酸。
- 4.转移上清液到新的离心管中，2-8°C 短时存放。长期保存选择-80°C 条件。

注意：血清收集后，1 mL 每管分装，避免冻融。存放于-80°C，干冰运输。

细胞上清：

- 1.细胞上清中的外泌体含量，取决于细胞类型和培养条件，如用膜亲和柱方法分离外泌体，建议单次反应用 16mL 细胞上清。
- 2.从细胞培养上清中分离泡状 RNA，使用无血清培养基或无泡血清制备的培养基。
- 3.收集细胞上清后，2-8°C 储存 6h，长期储存于-80°C。
- 4.收集的细胞上清，需在 4°C 条件下 3000xg 离心 15min（或用 0.8 μ m 滤膜过滤），去除额外的细胞或细胞碎片。
- 5.转移上清液到新的离心管中，2-8°C 短时存放。长期保存选择-80°C 条件。

尿液：

用离心管收集尿液样本，建议使用 0.8 μ m 滤膜过滤，去除额外的细胞或细胞碎片。

2-8°C 短时存放。长期保存选择-80°C 条件。

尿液可能含有各种代谢物，可以干扰 RNA 分析使用，例如，RT-PCR 或 RNA- seq。

为了确保所分离的 RNA 的最佳性能，我们建议分别分离长 RNA 和短 RNA(分别大于或小于约 200 nt)。

外泌体：

1.通过超速离心/膜亲和吸附/密度梯度离心等方法分离的外泌体，重悬于 1xPBS 或 Buffer XE 中。使用尺寸排阻色谱柱也可以实现不减少体积的缓冲交换。

2. 2-8°C 短时存放。长期保存选择-80°C 条件。

注意事项：

- 在凝血过程中，血小板会分泌大量的外泌体，有研究发现血清中有接近50%的外泌体来自额外的分泌。所以一般选择血浆，如果要研究与血小板相关疾病的话，血清更适合。血小板或组织分泌的外泌体，需客户自己分离。
- 2mL血清血浆提取的外泌体颗粒数约 10^8 - 10^9 ，可满足电镜和WB实验，BCA测定蛋白浓度为 2-4ug/uL
- WB常用的MARKER是CD63,CD81 CD9等
- 获得核酸类型：总RNA (含miRNA>18 nt)
- 建议新鲜制备样本，**避免任何冻融**

外泌体鉴定 (NTA / Western Blot / 电镜)

Exosomes

外泌体是大小 30-150nm 的胞外小泡，来自多泡内体，在细胞外信号转导中发挥作用。外泌体被磷脂双层膜包裹，含有蛋白质、血管活性白三烯和 small RNA，它们的组成随细胞微环境的变化而变化。

送样建议 (体液样本): 根据要求运输，到公司后分离外泌体。

送样建议 (外泌体): 重悬于适当体积的 PBS 中，-80°C 保存、干冰运输。

电镜鉴定： 准确的区分外泌体和其他细胞外囊泡，成像直观，区分精确

如果是使用聚合物沉淀分离的外泌体，在电镜实验前请超滤反复洗涤样本数次，去除杂蛋白后进行检测，效果更好。

WB 鉴定： 针对外泌体的定性分析，结合电镜分析结果

常见的抗体指标有 CD9,CD63,CD81 等

聚合物沉淀法分离的样本做 WB，上样量提高，沉淀法会带来一定量的杂蛋白。

一般有 2 个外泌体标志物蛋白进行检测的结果即可，

NTA 鉴定： 了解外泌体的大小分布及密度

1) Zetaview 最佳检测浓度为 10^7 Particles / mL，最低检测浓度是 10^5 Particles / mL，

最低上机检测体积 2mL。因此，建议提供不少于 30 μ L 的原始样本用于检测，且避免

对送检样本的过度稀释。参考如下：

- i. 样本浓度大于 10^{11} Particles/mL，送样 30 μ L；
- i. 样本浓度接近 10^{10} Particles/mL，送样 50 μ L；
- i. 样本浓度小于 10^9 Particles/mL，送样大于 2 mL。

2) 寄送囊泡类样本，建议使用干冰运输，其他类型样本请根据实际情况决定。

注意事项：

- 请勿使用PCR管寄送样本。
- 检测送样单需随样本一起寄出，并尽可能完善填写内容，以便公司结合样本信息选择最优检测方案。
- 外泌体分离（超离法/沉淀法/尺寸排阻法/膜亲和法）：从不同来源途径分离得到的外泌体，注意提前离心去除杂质（细胞，细胞碎片，凋亡小体）