

# 蛋白组样本要求及准备说明

## 目录

1、样本准备的通用要求 .....	10
2、蛋白组样本准备及要求 .....	10
2.1 蛋白组样本准备注意事项 .....	10
2.2 蛋白组样本量要求 .....	12
2.3 蛋白组样本准备指南 .....	13
2.3.1 常见动物组织（心、肝、脾、肺、肾、肠、脑、肌肉等） .....	13
2.3.2 软体动物（贝类） .....	14
2.3.4 软骨组织 .....	14
2.3.5 动物毛发等 .....	14
2.3.6 植物茎、叶、花、根、树皮、种子等 .....	14
2.3.7 草本植物、藻类、蕨类 .....	14
2.3.8 鲜果肉 .....	14
2.3.9 花粉 .....	15
2.3.10 种子 .....	15
2.3.11 细菌 .....	15
2.3.12 真菌类（菌菇） .....	15
2.3.12 悬浮培养细胞 .....	16
2.3.13 贴壁培养细胞 .....	16
2.3.14 血清 .....	16
2.3.15 血浆 .....	17
2.3.16 唾液 .....	17
2.3.17 脑脊液、关节液等体液 .....	17
2.3.18 血清血浆-外泌体 .....	17
2.3.19 细胞上清-外泌体 .....	17
2.3.20 细胞培养上清 .....	18
2.3.21 细菌培养上清 .....	18
2.3.22 发酵液 .....	18
2.3.23 蛇、蝎毒液等（干重） .....	18
2.3.24 微量样本或石蜡样本等 .....	19
2.3.25 细胞器等亚细胞结构样本 .....	19
2.3.26 LC-MSMS 质谱鉴定项目 .....	19
2.4 外泌体分离及鉴定说明 .....	21
2.4.1 外泌体富集方法 .....	21
2.4.2 外泌体分离鉴定 .....	21
2.5 蛋白组生物学重复建议 .....	22
3、拒收的传染性/致病性实验样本列表 .....	22
4、关于新冠、HIV 样本说明 .....	23

## 1、样本准备的通用要求

- 1.1 代表性原则：取样代表性关系到实验结果是否具有科学意义，因此建议老师根据实验目的慎重选择取样方案。
- 1.2 准确性原则：代表性样本的各种特征数据必须被准确记录，按要求（低温、迅速）采集、制备、贮存、运输。
- 1.3 迅速性原则：样本质量是影响实验结果的最关键因素，因此在采集、制备、贮存、运输过程中应尽可能地做到迅速，最大限度的缩短从样本采集到实验的时间。
- 1.4 低温原则：除胶条样本外，所有样本离体后，应尽快置于液氮、干冰或-80℃冰箱中，以避免降解。
- 1.5 寄送原则：如果样品要寄送外地，根据路程计算好时间，按照每天5公斤干冰的量准备，防止样品在路上耽搁而造成降解。

## 2、蛋白组样本准备及要求

### 2.1 蛋白组样本准备注意事项

- (1) 在允许的条件下，建议多准备一份样品作为备用；
- (2) 如无特别要求，建议所有的样品提供原样即可。如果是特殊情况，需要自己提取蛋白的，需要附上详细的操作流程及试剂。
- (3) 如客户有特殊前处理需求，需要在项目开始前沟通，在送样登记表中备注说明，并尽量提供方法或者文献，以避免影响实验结果。
- (4) 所有样品都在-80℃保存且避免冻融，在寄送时请保证干冰量足够。一般建议 10 公斤，偏远地区 20 公斤。
- (5) 原则上不建议客户自行在样品中添加裂解液；若提供的样品是已添加裂解液的样品请务必同时添加蛋白酶抑制剂，磷酸化项目一定要添加磷酸酶抑制剂。
- (6) 样品标记清晰明确，与样品信息单中保持一致。
- (7) 生物学重复的样品请备注清楚；如条件允许，请将每个样品的量在样品信息单中表明。
- (8) 所有样品分组的编号，务必用英文字母+数字（CK-1、Control），避免使用中文名（如：对照组、处理组、加药组）。

- (9) 不建议使用锡箔纸、玻璃容器保存运输样本，锡箔纸和玻璃容器在冷冻情况下较易破碎；建议使用离心管或冻存管保存及运输样品。
- (10) 细胞样本中细胞个数大于 $10^7$ 个，低于 $10^6$ 个时建议进行PCT抽提处理，细胞取好后，首先用PBS清洗一下细胞表面，因为大部分培养基里面都含有血清，这部分血清得洗干净。
- (11) 骨头等硬度较大的样品，建议样品研磨之后再寄送。
- (12) 如果样品成分含有毒性或腐蚀性物质，必须事先声明，并在样品登记表和样品标签上注明。
- (13) 如果样品为病原性微生物或者具有侵染性的病变组织必须严格灭活后再送样并在样品登记表和样品标签上注明!!!
- (14) 物种不同会导致样本量收集难度不同，如不清楚量是否足够，请提前咨询技术部门。
- (15) 除以上所列样品之外，其它或特殊样品的准备要求量可视具体情况进行沟通后确认。

## 2.2 蛋白组样本量要求

### 3D-组学样本量要求

实验类型	iTRAQ/TMT		label free/PRM/DIA		iTRAQ/TMT-磷酸化		Label free 磷 酸化/糖基化	Label free 乙 酰化/泛素化
	建议量	最低量	建议量	最低量	建议量	最低量	建议量	建议量
动物组织 (心肝肺等)	50mg	20mg	50mg	20mg	50mg	20mg	100mg	200mg
软体动物 (吸虫等)	100mg	50mg	100mg	50mg	200mg	50mg	200mg	500mg
动物毛发等	100mg	50mg	200mg	50mg	200mg	50mg	咨询	咨询
软骨组织	200mg	100mg	500mg	200mg	500mg	200mg	1g	2g
植物茎、叶、花等	500mg	200mg	300mg	100mg	500mg	100mg	1g	2g
植物树根、树皮等	500mg	200mg	500mg	100mg	2g	500mg	2g	4g
细小种子 (如谷物等)	200mg	100mg	200mg	100mg	500mg	300mg	1g	2g
鲜果肉	10g	5g	10g	5g	10g	5g	20g	50g
花粉	100mg	50mg	100mg	50mg	100mg	50mg	500mg	1g
菌类 (菌体沉淀)	200mg (10 <sup>7</sup> )	100mg	200mg (10 <sup>7</sup> )	100mg	200mg (10 <sup>7</sup> )	100mg	500mg (2×10 <sup>7</sup> )	1g (4×10 <sup>7</sup> )
悬浮培养细胞	≥1×10 <sup>7</sup> 个	≥5×10 <sup>6</sup> 个	≥1×10 <sup>7</sup> 个	≥5×10 <sup>6</sup> 个	≥2×10 <sup>7</sup> 个	≥1×10 <sup>7</sup> 个	≥2×10 <sup>7</sup> 个	≥5×10 <sup>7</sup> 个
贴壁培养细胞	≥1×10 <sup>7</sup> 个	≥5×10 <sup>6</sup> 个	≥1×10 <sup>7</sup> 个	≥5×10 <sup>6</sup> 个	≥2×10 <sup>7</sup> 个	≥1×10 <sup>7</sup> 个	≥2×10 <sup>7</sup> 个	≥5×10 <sup>7</sup> 个
血清	≥100 μL	50 μL	≥100 μL	50 μL	≥100 μL	50 μL	≥100 μL	300 μL
血浆	≥100 μL	50 μL	≥100 μL	50 μL	≥100 μL	50 μL	≥100 μL	300 μL
唾液	≥500μL	500μL	≥500μL	500μL	≥500μL	500μL	咨询	咨询
脑脊液、关节液等体液	≥100μL	60μL	≥100μL	60μL	0.5-5mL	60μL	咨询	咨询
细胞/细菌培养上清、发酵液(不同细胞分泌蛋白量不同, 需根据试抽提结果判定)	50mL	20mL	50mL	20mL	100mL	50mL	咨询	咨询
外泌体 (需要的血清/血浆初始体积)	10mL	5mL	10mL	5mL	20mL	10mL	咨询	咨询
外泌体 (需要的细胞上清初始体积)	≥100mL	50mL	≥100mL	50mL	≥200mL	100mL	咨询	咨询
蛇、蝎毒液等 (干重)	≥50mg	30mg	≥50mg	30mg	≥300mg	200mg	咨询	咨询
小鼠眼球晶状体	3-4 颗	3 颗	3-4 颗	3 颗	3-4 颗	3 颗	咨询	咨询
直接提供蛋白溶液	150μg	100μg	50μg	DIA项目蛋白量要求=(200/样品数+30)ug/样本	200μg	150μg	2mg	4mg

## 4D-修饰组学样本量要求

实验类型	磷酸化 (4D-labelfree/4D-DIA)		糖基化 (4D-labelfree/4D-DIA)		泛素化、乙酰化 (4D-labelfree)	
	建议量	最低量	建议量	最低量	建议量	最低量
动物组织 (心肝肺等)	100mg	50mg	100mg	50mg	200mg	100mg
软体动物 (吸虫等)	200mg	100mg	200mg	100mg	500mg	300mg
软骨组织	1g	500mg	1g	500mg	2g	1g
植物茎、叶、花等	1g	500mg	1g	500mg	2g	1g
植物树根、树皮等	2g	1g	2g	1g	4g	2g
细小种子 (如谷物等)	1g	500mg	1g	500mg	2g	1g
鲜果肉	20g	10g	20g	10g	50g	30g
花粉	500mg	300mg	500mg	300mg	1g	500mg
菌类 (菌体沉淀)	500mg ( $2 \times 10^7$ )	200mg	500mg ( $2 \times 10^7$ )	200mg	1g ( $4 \times 10^7$ )	500mg
悬浮培养细胞	$\geq 2 \times 10^7$ 个	$\geq 1 \times 10^7$ 个	$\geq 2 \times 10^7$ 个	$\geq 1 \times 10^7$ 个	$\geq 5 \times 10^7$ 个	$\geq 2 \times 10^7$ 个
贴壁培养细胞	$\geq 2 \times 10^7$ 个	$\geq 1 \times 10^7$ 个	$\geq 2 \times 10^7$ 个	$\geq 1 \times 10^7$ 个	$\geq 5 \times 10^7$ 个	$\geq 2 \times 10^7$ 个
细胞/细菌培养上清、发酵液	80mL	50mL	80mL	50mL	150mg	100mL
直接提供蛋白溶液	2mg	1mg	2mg	1mg	4mg	2mg

## 2.3 蛋白组样本准备指南

### 2.3.1 常见动物组织 (心、肝、脾、肺、肾、肠、脑、肌肉等)

PBS 洗涤去除残留血液和污染物，剔除无关的干扰组织（血管、脂肪、结缔组织等），冲洗干净，用组织剪或手术刀将组织分离成  $1\text{cm}^3$  左右的小块，液氮速冻 5 min，保存在  $-80^\circ\text{C}$ ，干冰运输。

#### 注意：

- 1) 对于人体手术切除的组织，最好用PBS（磷酸缓冲盐溶液，作为溶剂，起溶解保护试剂的作用）取完之后直接去血。
- 2) 对于小鼠、大鼠、兔子之类的组织样品，建议用灌流的方式来去血，尤其是像肝脏、胃、心脏这类大的组织，可以直接用灌流的方式去血，去得最干净。其次的方案是在后期剪碎的时候去血。

3) 对于组织重量远低于 100mg 的样本，如斑马鱼大脑组织、小鼠海马组织等，可考虑混样。

### 2.3.2 软体动物（贝类）

尽量选择大小相近的样品，将样品表面清洗干净，清除泥沙，将样品存放于离心管，较大的样品可剪成小块后存放，液氮速冻5min，保存在-80°C，干冰寄送。

### 2.3.3 无脊椎动物（绦虫、吸虫、线虫）

将样品从宿主组织中分离，用PBS洗涤去除来自宿主的污染，液氮速冻5min，保存在-80°C，干冰寄送。

### 2.3.4 软骨组织

PBS 洗涤去除残留血液和污染物，用手术刀将软骨切成 1cm<sup>3</sup> 左右的小块。液氮速冻 5 min，保存在-80°C，干冰寄送。

### 2.3.5 动物毛发等

用适量 2% SDS，50mM 磷酸钠（pH7.8）缓冲液漂洗样品或用PBS进行清洗，去除污染物，干燥，液氮速冻，保存在-80°C，干冰寄送。

### 2.3.6 植物茎、叶、花、根、树皮、种子等

收集样品，液氮速冻（如样品表面有泥土或明显污染物，需要在液氮速冻前用 PBS 清洗，吸水纸吸去表面液体），液氮速冻至少 5 min，保存-80°C。

#### 注意：

- 1) PBS 漂洗要尽快；
- 2) 大部分根组织比较脆弱，被挤压后会变成浆糊状，因此推荐保存至离心管中。
- 3) 采集样本时保持样本一致性，尤其是同一组样本（颜色、衰老程度、叶脉占比、光照、位置等）。

### 2.3.7 草本植物、藻类、蕨类

收集样品，液氮速冻（如样品表面有泥土或明显污染物，则液氮速冻前用 PBS 清洗，吸水纸吸去表面液体），液氮速冻 5 min，保存-80°C。

### 2.3.8 鲜果肉

1. 对于含水量高、体积较大的果实（番茄、西瓜、苹果等）需要先用锋利的刀分割成“均匀”合适的小块（≈200

mg/管) 分装至2mL离心管中, 标号后迅速放入液氮中冷冻处理5min以上。

2. 对整个果实进行提取的(整粒葡萄等), 需要把果实装在50mL离心管中, 管子做好标记后(标签纸同时放入自封袋中, 注明样本信息) 迅速放入液氮中冷冻处理5min以上。

#### **注意:**

1) 对多汁的果实进行取样很难保持均一性(如番茄、皮、果肉、果瓢、籽等), 强烈建议将整个果实进行研磨、冻干, 对粉末进行称重分装。

2) 不推荐用锡箔纸包裹。

### **2.3.9 花粉**

植物开花期收集花粉, 解剖显微镜下检查花粉, 用解剖针去除花药碎片等杂质, 转入 EP 管中, 光学显微镜下检查花粉的形态和纯度, 液氮速冻 5 min, 保存于-80°C, 干冰寄送。

### **2.3.10 种子**

对于细小的颗粒种子(拟南芥种子、谷物种子等), 可以先将同一组的植株种子混匀后再分装(≈200 mg/管)至 1.5mL 离心管中。标号后迅速放入液氮中冷冻处理至少 5min。

### **2.3.11 细菌**

1. 收集菌液, 4°C, 3000-5000×g 离心 10 min, 收集菌体(1×10<sup>8</sup>个细菌为宜), 弃上清。

2. 用预冷的 PBS 小心重悬清洗沉淀 3 次, 每次 4°C, 3000-5000×g 离心 10 min, 弃上清。

3. 收集管底沉淀, 液氮速冻 5 min, -80°C 冻存, 干冰寄送。

#### **注意事项:**

1) 注意样品不要被杂菌污染, 在培养前对所使用到的容器做高温高压灭菌处理。

2) 菌体数量不同样本间需要保持一致;

3) 一般OD<sub>600</sub>≈0.6 时, 细菌处于对数期, 其浓度为 10<sup>8</sup> cells/mL。此标准为经验值, 需根据客户实验室具体情况进行调整。

4) 请先拿空离心管的尖端插入液氮中试试离心管的质量, 如果不破则可进行样本取材。

5) 操作尽量迅速, 培养基尽量倒干净, 用滤纸条将底部残留的培养基吸尽最好。

### **2.3.12 真菌类(菌菇)**

收集样品，使用PBS清洗，吸水纸吸去表面液体；装入离心管中，液氮速冻5min，保存于-80℃。

### 2.3.12 悬浮培养细胞

1. 连同培养基转移到 1.5 mL EP (进口) 中。
2. 4℃, 1000 ×g 离心 10 min 收集细胞 ( $1 \times 10^7$  个细胞为宜), 弃上清。
3. 用预冷的 PBS 小心重悬清洗沉淀一次, 1ml PBS 重悬细胞后转移到新的 1.5ml 离心管中, 1000 ×g 离心 10 min, 收集细胞, 弃上清。
4. -80℃ 冻存, 干冰寄送。

注意事项:

- 1) 操作尽量迅速, 培养基尽量倒干净, 建议用滤纸将残留的培养基吸尽。
- 2) 取对数生长期, 培养至同一时期的细胞, 建议多准备样本, 以备后续使用。

### 2.3.13 贴壁培养细胞

1. 用移液器吸除培养基;
2. 加入灭菌 PBS (若用移液枪加, 则靠着培养皿壁加入, 以免将细胞冲起), 平放轻轻摇动 1 分钟洗涤细胞, 然后弃 PBS;
3. 用干净的细胞刮棒将细胞刮于培养皿的一侧 (动作要快), 将细胞尽量全部转移至离心管中;
4. 细胞刮之后, 可以用PBS再涮洗一下, 转移到离心管, 最后再简单离心收集沉淀;
5. 液氮速冻 5 min, 保存于-80 °C, 干冰寄送。

### 2.3.14 血清

1. 使用真空采血管收集血液, 轻轻地上下颠倒混匀 5~6 次,
2. 4℃ 静置 30-60min, 让全血凝集;
3. 4 度 1500-2000×g 离心 10min, 取上清;
4. 用移液器将上层淡黄色血清转移到离心管中, 每管0.2 mL, 加入蛋白酶抑制剂, 混匀, 瞬时离心;
5. 液氮速冻 5min, 保存于-80℃。

注意:

1. 采血过程中注意消毒, 防止微生物污染;

2. 离心速率建议不宜过快，以免血细胞破碎；
3. 血清样本冰冻后避免反复冻融；
4. 在运输样本过程提供干冰保证低温（环境）；

### **2.3.15 血浆**

1. 使用抗凝管采集全血，颠倒混匀 8~10 次，4 度 1300-2000×g 离心 10 min，取上清；
2. 用移液器将血浆转移到离心管中，加入蛋白酶抑制剂，混匀，瞬时离心；
3. 液氮速冻 5min，保存于-80°C。

注意：EDTA，肝素钠和柠檬酸钠的抗凝管都可进行蛋白组实验，但如果做同时要代谢建议不采用柠檬酸钠，要做转录组的不要用肝素钠等。

### **2.3.16 唾液**

1. 禁食两小时以上，9-12 am 取样，1000g-2000g 离心 5min，（或使用 0.22um 滤膜过滤），取上清，液氮速冻 5min，
2. -80°C保存。

### **2.3.17 脑脊液、关节液等体液**

1000g-2000×g 离心 5min，使用 0.22μm 滤膜过滤，取上清，液氮速冻 5min，-80°C保存，干冰寄送。

### **2.3.18 血清血浆-外泌体**

3. 用超速离心或其他方法提取外泌体，用电镜观察外泌体形态（推荐）；
4. 液氮速冻 5min，-80°C保存，干冰运输，不要冻融。

注：如客户自行抽提，建议采用试剂盒进行外泌体分离提取。

详见文档“外泌体送样说明”。

### **2.3.19 细胞上清-外泌体**

1. 细胞在合适的培养基中培养至 70%面积，去掉培养基，PBS 洗三次；
2. 换用无血清培养基生长一定时间（如 24 小时）后收集，4 度 300g 离心 10 分钟取出细胞，取上清；
3. 液氮速冻 5min，-80°C保存，干冰运输。（注：如客户自行抽提，建议采用试剂盒进行外泌体分离提

取。)

### 2.3.20 细胞培养上清

1. 在收集前改用不完全培养基培养，即用不加血清的培养基进行培养。
2. 待细胞铺满 80%左右，用移液枪吸取上清。
3. 4°C，6000rpm 离心 5min，弃去底部可能出现的固体沉淀。
4. 液氮速冻 5min，冻存在-80°C，干冰寄送。

### 2.3.21 细菌培养上清

- 1) 方法一：培养好的菌液混匀后，取10mL菌液，用0.2 $\mu$ m孔径的过滤膜进行快速抽滤，去除菌体。将滤液按 1mL/well进行分装，冻存到-80°C冰箱内，足量干冰寄送。
- 2) 方法二：培养好的菌液混匀后，取2mL菌液，3000rpm，4°C离心10min，取上清，冻存到-80°C冰箱内，足量干冰寄送。

注意：因培养基中可能含有高糖、高盐、高渗等成分，可能影响后续质谱上机检测，因此含有培养基的样本需售前咨询。

### 2.3.22 发酵液

10000 rpm-20000 rpm 离心 30-60 min，（或使用 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤），取上清；液氮速冻 5min，冻存在-80°C。

### 2.3.23 蛇、蝎毒液等（干重）

一般分为 2 种方法，请根据自身实验条件进行选择：

- 1) 真空干燥（减压干燥）：在低压下，使蝎毒液中的水分快速蒸发的方法。蝎毒干燥后，应缓缓旋开活塞，以防止空气冲散蝎毒干粉。最后在净化条件下取出干粉，立即分装，密封低温保存。
- 2) 真空冷冻干燥：先将蝎毒液在低温冰柜中预冻成固体，然后使用冷冻干燥机进行干燥和低温保存。由于冷冻干燥是在低温和高真空度下进行的，所以毒液在冻干过程中不起泡，不粉不沾壁、疏松、易取出、易溶于水、有利于保存。

### 2.3.24 微量样本或石蜡样本等

样本类型	建议样本量 (PCT-DIA)	iST试剂盒
细胞	50-100 万个细胞以上	$1 \times 10^4$ 个细胞以上
穿刺样本	$\geq 1-2$ mg	$\geq 5$ mg
新鲜组织	$\geq 1-2$ mg	1-3 mm <sup>3</sup> of mammalian tissue samples (for harder tissues like heart or muscle, use $\sim 1$ mm <sup>3</sup> ).
石蜡切片	10 $\mu$ m 的石蜡切片 10 片/sample (每个石蜡切片的重量 $\geq 1$ mg)	10 $\mu$ m 的石蜡切片 10 片/sample (每个石蜡切片的重量 $\geq 1$ mg)
OCT切片	10 $\mu$ m 的石蜡切片 10 片/sample (每个石蜡切片的重量 $\geq 1$ mg)	10 $\mu$ m 的石蜡切片 10 片/sample (每个石蜡切片的重量 $\geq 1$ mg)

### 2.3.25 细胞器等亚细胞结构样本

样本类型	需要客户提供试剂盒或另付费
线粒体	需要
叶绿体	需要
外泌体	需要

### 2.3.26 LC-MSMS 质谱鉴定项目

#### 1. 胶条样本

胶条或者泳道皆可，建议考马斯亮蓝染色（条带清晰，无降解）；请用 EP 管装好，不用加任何保存液，用冰袋寄送即可，颜色非常浅的条带可取多个重复样本放一起。  
常温保存，冰袋运输。

#### 2. 蛋白溶液样本

如果是磁珠样本，请不要加 loading buffer 去煮，直接将连着磁珠的蛋白溶液用干冰寄送就好。（如果需要跑胶，建议加 loading buffer 去煮；如果不跑胶，则不用添加 loading buffer。）磁珠样本如果需要公司跑胶，需要收取跑胶的费用，如果不需要跑胶，直接进行溶液内酶解，然后上质谱即可。

-80 度冻存，干冰运输。

**注意:**

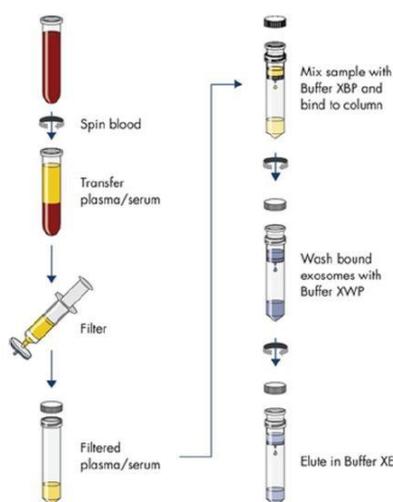
清洗抗体/珠子复合体几次，以去除与抗体非特异性结合的细胞物质，也有助于减少粘性细胞成分与珠子的非特异性结合。一般情况下，用冷的裂解缓冲液、去离子水或PBS洗涤。此步需要优化，以找到合适的水平，不破坏蛋白质的相互作用。保存此步中使用过的清洗buffer，如果目的蛋白和伴侣蛋白从裂解液中耗尽，清洗缓冲液可以说明。

## 2.4 外泌体分离及鉴定说明

### 2.4.1 外泌体富集方法

(1) QIAGEN 试剂盒提取步骤（首选）：

<https://www.qiagen.com/cn/resources/download.aspx?id=2f6fda57-c00f-4425-9705-9f8795aad12b&lang=en>



外泌体分离实验流程图

(2) 外泌体富集方法（超高速离心）

详见“外泌体送样说明”。提示：目前首选该试剂盒进行外泌体分离。如需选用其他外泌体分离法（如 SBI 试剂盒提取或超高速离心，提前做好沟通即可，请知悉！）

### 2.4.2 外泌体分离鉴定

(1) 电子显微镜检测外泌体形态方法

由于超高真空技术的发展，场发射电子枪的应用得到普及，现代先进的透射电镜的分辨率已经达到 1 nm 左右，足够用来进行外泌体尺寸的测量。鉴于 TEM 的工作特点，在外泌体研究中，能够直接观察到样品中外泌体的形态。并且 TEM 具有很高的分辨率，能够鉴别不同大小的外泌体。但 TEM 对样品的预处理和制备上面要求较高，样品的准备阶段比较复杂，不适合对外泌体进行大量快速的测量。而且由于外泌体经过了预处理和制备过程，无法准确的进行外泌体浓度的测量。

1) 将培养液等体液通过超速离心分离得到的外泌体，重悬于 30  $\mu$ L 的 PBS 中；

- 2) 吸取样品 10  $\mu$ L 滴加于铜网上沉淀 1 min, 滤纸吸去浮液;
- 3) 醋酸双氧铀 (磷钨酸) 10  $\mu$ 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) 80 kv 进行电镜检测成像。

## (2) NanoSight 检测外泌体粒径方法

外泌体是直径约为 30 - 150 nm 的微囊泡, 利用 NanoSight 检验富集的颗粒是否符合外泌体直径特征 (图9)。纳米颗粒跟踪分析 (NTA) 技术允许实时地对悬浮液中 50 nm - 1,000 nm 直径范围内特定的外泌体和微囊泡进行逐个的直接成像和观察。同时, NTA 可提供高分辨率的粒度分布图表和浓度信息。该技术易用、快速、稳健、准确且使用成本低, 是对现有方法的一个良好补充。

- 1) 获得的 exosomes 浓缩液按比例稀释 10 倍至 10000 倍;
- 2) 从最大稀释度样品开始检测;
- 3) 外泌体的颗粒数量在  $10^7$  -  $10^8$  时样品为最佳;
- 4) 软件输出外泌体浓度及直径颗粒度报告。

## (3) Western Blot 检测外泌体标志物方法

可收集外泌体蛋白和细胞全蛋白进行 western blot 实验, 比较外泌体和细胞全蛋白中 CD63、CD9、CD81、TSG101、HSP90 等蛋白的表达差异情况, 若收集的外泌体样品富集以上蛋白, 则说明样品符合外泌体特征。**提示: 首选电镜法进行鉴定, 也可以选择其他方法进行外泌体鉴定。**

## 2.5 蛋白组生物学重复建议

微生物和植物: 建议每组生物学重复 $\geq$ 3个;

模式动物: 建议每组生物学重复 $\geq$ 3-5 个;

临床样本: 建议每组生物学重复 $\geq$ 5-10 个。

## 3、关于特殊 (强传染性, 病原体类, 病变组织) 样本

详见文档“拒收的传染性致病性实验样本列表”

#### 4、关于新冠、HIV 样本说明

详见文档“2020.08-蛋白组分析-关于新冠、HIV 项目的说明-2020”