

奥科医学外泌体样本收集与寄送指南

外泌体提取方法：

超速离心法

过滤离心法

密度梯度离心法

亲和层析分离法

外泌体沉降法

凝胶排阻法

免疫磁珠法

色谱分离法

后续外泌体鉴定：

WB 检测外泌体标记蛋白

透射电镜检测

NTA 粒径分析



外泌体样本收集与寄送指南

1. 血清样品

- (1) 用采血针和普通血清管(不含任何试剂, 10 ml 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 3000 g 离心 15 min, 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 10-15 ml 全血)。

2. 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)。

3. 细胞上清

- (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。

提示: 送样量最好 50 ml 以上。

4. 尿液

(1) 收集尿液时, 应该尽量选择受试者的“新鲜”尿液 100 ml, 并注意避免细菌污染, 收集前注意对饮食的控制;

(2) 并于 3000 g 离心 15 min, 去除细胞或细胞碎片;

(3) -80 °C冰箱中保存。

5. 脑脊液

(1) 收集脑脊液 10 ml, 避免受到血液污染;

(2) 并于 3000 g 离心 15 min, 去除细胞或细胞碎片;

(3) -80 °C冰箱中保存。

注意事项:

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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。

(4) 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)。

(5) 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 PAX gene 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。

(6) 储存条件以及储存时间影响外泌体得率, 保存在-80 °C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)。