

外泌体的提取、鉴定和保存方法研究进展*

蒲双双 (山东中医药大学附属医院检验科, 济南 250011)

摘要: 外泌体是一种直径介于 40~100 nm 之间的膜性囊泡, 由活体细胞分泌产生, 广泛存在于人体各种体液中, 富含多种蛋白质和 RNA, 是细胞间传递生物信息的重要载体, 在生理调节和病理发展中都发挥重要作用, 是近年来研究的热点。为更深入研究外泌体生物学作用机制, 提取高质量的外泌体是首要步骤, 基于此, 笔者就外泌体的各种提取方法及其优缺点以及鉴定和保存方法的研究进展作如下综述, 希望此文能为研究者们提供一些参考, 为后续研究打好基础。

关键词: 外泌体; 提取; 鉴定; 保存

中图分类号: R446 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)05-157-04

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7414. 2018. 05. 044

Research Progress in Isolation, Identification and Preservation of Exosomes

PU Shuang-shuang (Department of Clinical Laboratory,

Affiliated Hospital of Shandong Traditional Chinese Medicine University, Jinan 250011, China)

Abstract: Exosomes are 40~100nm round membrane vesicles secreted by almost all living cells, widely exists in various body fluids of the human body. The protein and RNA in exosome made it an important carrier of biological information transmission between cells, which play important role in regulation of physiological and pathological processes, so exosome became research hotspot in recent years. But the isolation of high quality exosomes is the basis step, so the research progress of isolation, identification and preservation methods of exosomes and their advantages and disadvantages are summarized as follows. It is hoped that this article can provide some references for researchers and lay a good foundation for follow-up studies.

Keywords: exosome; isolation; identification; preservation

外泌体, 于 1987 年由 Johnstone 等^[1]在研究绵羊网织红细胞时发现, 是一种直径介于 40~100nm 的囊泡样结构。在电子显微镜下, 外泌体由双层磷脂膜包裹, 内含丰富的蛋白质以及 micro RNA 等成分, 其中一些独特的蛋白(如 CD9, CD63, CD81, HSP70, TSG101 等)还可作为外泌体的特征蛋白, 在外泌体提取和鉴定中起重要作用。起初, 外泌体被认为是细胞排泄的废物, 但近年来, 越来越多的研究表明外泌体参与物质运输, 还携带和传递重要的生物信息^[2], 在介导免疫抗原递呈、树突状细胞的活化、神经退行性疾病发生、肿瘤细胞抗原的转移及肿瘤诊断治疗中发挥重要作用^[3~5]。随着蛋白质组学和基因组学等分析手段的发展, 外泌体介导的生物学效应及其背后的分子机制将会更加清晰, 但在此研究过程中, 外泌体的提取纯化、鉴定及合理保存是首要的步骤, 也是一切后续实验的基础, 毕竟只有高纯度、高活性的外泌体才能确保后续实验的质量和可信度。为此我们对目前常用的外泌体提取、鉴定和保存的方法及其优缺点做如下综述:

1 外泌体提取方法

1.1 超速离心法(差速离心法) 超速离心法是目前制备外泌体的经典方法, 是根据外泌体的沉降系

数差速离心将其分离出来。该方法是在 4℃ 条件下依次以 300 g, 2000 g, 10 000 g 离心以去除细胞与细胞碎片, 再以 100 000 g 超速离心达到分离、富集外泌体的目的。磷酸缓冲液(PBS)清洗可部分去除残存蛋白质。超速离心法具有操作简单、不被分离试剂污染、获得的外泌体数量较多的优点, 因此最常用, 也被认为是外泌体提取纯化的金标准。但是超速离心法, 需要昂贵的超高速离心机设备投入, 每次处理的样本量较小, 过程费时, 电镜鉴定时还发现外泌体易聚集成块。研究发现, 超速离心后富集的外泌体中通常含有杂质蛋白及凋亡小体、脱落微泡等^[6], 纯度不高, 且上清中仍能检测到大小介于 30~300 nm 之间的囊泡^[7], 存在外泌体丢失的现象。此外, 也有研究认为反复的高速离心会导致外泌体破裂, 引起成分丢失, 影响外泌体质量^[8]。

1.2 蔗糖密度梯度离心法 外泌体易在 1.13~1.19 g/ml 密度范围的蔗糖溶液中富集, 基于此特性, 可将样本和蔗糖梯度溶液一起超速离心, 外泌体沉降到等密度区得以分离纯化, 这就是蔗糖密度梯度离心法。此方法需预先配好连续梯度蔗糖溶液, 置于离心管底部, 样本铺在上部, 再 4℃ 100 000 g 超速离心。蔗糖对细胞无毒, 粘度不高且 pH 中性, 用该法获得的外泌体纯度也较高, 但前期准备

* 作者简介: 蒲双双(1983—), 女, 硕士, 研究方向: 分子生物学, E-mail: 236208893@qq.com。

工作过于复杂,易受离心率外因的影响^[9],所得外泌体中也含有难以去除的高密度化学物。也有研究提出该法不适合临床生物标志物研究,因为从血清及尿液中提取外泌体的纯度较低,而仅适用于细胞培养液中外泌体的提取^[10]。

1.3 超滤法 是将溶剂及小分子物质过滤到膜的另一侧,而将相对大分子物质截留在超滤膜上,以达到分离的目的。外泌体直径范围 40~100 nm,我们用孔径小于 100 nm 的超滤膜短时间低速离心就可以分离样本中的外泌体。目前超滤法分压力超滤和离心超滤两种,一般认为离心法较优。通常离心力越高、离心时间越长所得外泌体的浓度越高,但离心力太大,离心时间太长又会导致超滤膜破裂,因此适度的离心力和时间对于分离成功很重要。也有研究提出,50~200 ml 样本更适合采用离心法,而样本量大于 400 ml 时适合用压力法^[6]。超滤法操作简单,对样本体积要求低,只需低速离心,能大大减少超高速引起的外泌体破裂。但该方法需要考虑膜的孔径范围,外泌体和大分子蛋白质可能粘附堵塞滤孔,影响外泌体提取率和纯度^[8]。Cheruvanky 等^[11]先利用纳米超滤膜分离得到尿外泌体,后 Merchant 等^[12]换用低蛋白质结合的聚偏氟乙烯膜,减小了尿蛋白干扰,分离到的尿外泌体纯度有所提高。

1.4 PEG 沉淀法 聚乙二醇(PEG)是一种水溶性非离子化合物,通过竞争结合水分子,增加疏水性蛋白和脂质分子的相互结合力而沉淀外泌体。Rider 等^[13]曾用 7 种不同浓度 PEG6000 来提取细胞培养液外泌体,实验证实 8% PEG6000 提取外泌体纯度最高。该法是去除细胞及碎片后,在样本中加入终浓度为 8% PEG 6000 混匀,4℃ 过夜,次日 10 000 g 离心 1 h 即可获得外泌体。据研究,与超速离心法相比,PEG 能更有效沉淀外泌体,阳性分离率高,离心上清中外泌体水平极低。但化学添加剂是否会破坏外泌体的生物学活性还有待探讨。

1.5 色谱法 在色谱柱中,大分子物质不能进入凝胶孔,很快沿多孔凝胶间的缝隙被流动相洗脱出来;而小分子物质能进入凝胶孔,被滞留,更慢地被洗脱出来^[14]。此法分离到的外泌体纯度较高,在电镜下大小均一,但是获取量少,所需特殊设备也限制了其广泛应用。

1.6 免疫磁珠法 免疫磁珠上包被有单克隆抗体,能与外泌体表面特异性抗原结合,通过增加外泌体的相对分子量而将其分离出来。4℃ 条件下,样本与免疫磁珠共孵育 4 h,100 000 g 离心 1 h 得到底层免疫磁珠-外泌体复合物,蒸馏水或 PBS 冲洗后,再用甘氨酸-Tris-HCl 溶液洗脱即可最后获

得外泌体。该法提取的外泌体特异性最高,但酸性和低渗溶液可能会影响外泌体的形态及生物活性。还有免疫磁珠价格昂贵,不利于普及。

1.7 试剂盒提取法 近年出现了各种用于分离纯化外泌体的商品化试剂盒,有的通过过滤器过滤掉杂质成分,有的采用空间排阻色谱法进行分离,也有的用沉淀法沉淀外泌体。目前最常用的是由 System Biosciences(SBI)研发的 Exo Quick 试剂盒,聚合物沉淀剂 Exo Quick 预混液与样本 4℃ 共孵育,使外泌体聚集,第二天 1 500 g 离心 5 min, PBS 重悬沉淀即可获得外泌体。此法仅需简单混匀和常规离心即可从少量样本中获得丰富的外泌体,简便快捷、设备要求低。但沉淀中也含有其他囊泡及大分子杂质蛋白,影响外泌体纯度。也有报道提出该法影响外泌体蛋白和 mi RNA 组分,不利于后续蛋白组学和遗传学研究^[15,16]。

以上各种外泌体分离纯化方法各有优缺点,选择哪种方法应根据样本类型、样本量及后续实验而定,可以选择单一方法也可用几种方法的联合。例如李玉静等^[17]就采用蔗糖密度梯度离心联合 2 次 PEG6000 沉淀的方法,用低廉的提取成本获得胎盘来源外泌体。王鑫伟等^[18]将试剂盒提取的外泌体再经过超速离心纯化去除杂质,获得了更高纯度的外泌体。除了选择实验方法,标本的前处理也越来越受到重视,尤其是蛋白尿标本,其中大量蛋白会对外泌体的提取造成很大干扰。Alvarez 等^[19]在对商品化试剂 Exo Quick 提取尿外泌体的实验进行改进时,用还原剂二硫苏糖醇(DTT)对尿样本进行前处理,DTT 能打开 TH 蛋白的二硫键,减少 TH 蛋白对尿外泌体提取的干扰。后 Musante 等^[20]换用 3-[(3-胆固醇氨基丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)对尿样本进行前处理,据研究 CHAPS 比 DTT 能更好保持蛋白质的构象和酶活性,有利于外泌体蛋白质的后续功能和活性研究。

另外,酸碱度也会对实验结果产生很大影响,Ban 等^[21]在提取细胞培养液中外泌体时发现,在酸性条件下外泌体标记蛋白及 RNA 获得率较高,而碱性条件下外泌体蛋白质及 RNA 容易被破坏。还有试剂的用量及离心力大小等细节也需要在具体实验中不断摸索以期达到最佳效果。Alvarez 等^[19]发现,加大 Exo Quick 分离液的用量及提高离心力,可明显提高外泌体的纯度。

2 外泌体鉴定方法 用于外泌体鉴定的方法通常有以下几种,一般会采用两到三种方法联合鉴定。

2.1 透射电镜直接观察外泌体形态 将新鲜得到的外泌体溶液滴加到 100 目载样铜网上,室温静置 1 min,然后用磷钨酸钠溶液(或乙酸双氧铀溶液)

滴到铜网上负染 1 min, 用滤纸吸去余液, 就可将铜网放到透射电镜下观察外泌体形态。

2.2 免疫学方法 用流式细胞术, Western-blot, ELISA 等方法检测外泌体表面特异蛋白 CD9, CD63。用过量带特殊标记的单克隆抗体与外泌体特异蛋白抗原结合, 洗去未结合抗体后, 检测抗原抗体复合物上的特殊标记的量就代表外泌体量。除 CD9, CD63 外, 不同来源外泌体携有各自母细胞的特异分子, 如树突状细胞来源外泌体携带有 CD80, CD86^[22], 恶性胶质瘤细胞来源外泌体带有磷脂酰乙醇胺^[23], 因此可根据其不同来源设计特异性更高的外泌体鉴定方法。

2.3 PCR 或测序方法 分析遗传物质成为目前应用越来越广泛的外泌体鉴定方法。

2.4 其他方法 原子力显微镜, 能够测量外泌体的确切尺寸, 也可用于抗体标记后外泌体的检测。最近发展的图像流技术直接可视化和特性描述外泌体^[24]。

3 外泌体的保存 Zhou 等^[25]应用 PCR 法研究不同保存条件下尿液标本对提取外泌体后 RNA 含量的影响, 他从新鲜尿液及 -20℃ 冻存 24 h 的尿液中以相同方法提取外泌体, 检测比较 RNA 含量, 发现冻存尿液中提取的外泌体其 RNA 总量减少了 40%。Sokolova 等^[26]指出保存环境对维持外泌体直径及完整性至关重要, 他对提取好的脐带血来源外泌体进行研究发现, 外泌体常温保存 2 天直径下降 60%, 4℃ 保存 3~4 天直径下降 25%, -20℃ 短期保存直径无明显变化, 而 -80℃ 条件可长期保存。总之, 用于提取外泌体的样本要尽可能新鲜, 已提取外泌体要冻存, 且用于后续实验的外泌体的保存条件必须一致。外泌体能传递生物信息, 通过多种方式对细胞的生理活动进行调节并与多种疾病的发生发展密切相关, 是近年来研究的一大热点。外泌体分布广泛, 存在于人体几乎所有体液和细胞培养液中, 易无创获取, 但是想要提取到纯度高活性好的外泌体也颇具挑战, 以上外泌体提取、鉴定和保存的方法及优缺点, 希望可以为研究者们提供一些参考, 为后续实验研究打好基础。

参考文献:

- [1] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(19): 9412-9420.
- [2] El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2013, 12(5): 347-357.
- [3] Rao Q, Zuo B, Lu Z, et al. Tumor-derived exosomes elicit tumor suppression in murine hepatocellular carcinoma models and human in vitro [J]. *Hepatology*, 2016, 64(2): 456-472.
- [4] Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2015, 523(7559): 177-182.
- [5] Thompson AG, Gray E, Heman-Ackah SM, et al. Extracellular vesicles in neurodegenerative disease-pathogenesis to biomarkers [J]. *Nature Reviews Neurology*, 2016, 12(6): 346-357.
- [6] Lobb RJ, Becker M, Wen SW, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 27031.
- [7] Musante L, Saraswat M, Ravidà A, et al. Recovery of urinary nanovesicles from ultracentrifugation supernatants [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(6): 1425-1433.
- [8] Peterson MF, Otoc N, Sethi JK, et al. Integrated systems for exosome investigation [J]. *Methods*, 2015, 87: 31-45.
- [9] Zeringer E, Barta T, Li M, et al. Strategies for isolation of exosomes [J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015, 2015(4): 319-323.
- [10] Caradec J, Kharmate G, Hosseini-Beheshti E, et al. Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods [J]. *Clinical Biochemistry*, 2014, 47(13/14): 1286-1292.
- [11] Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, et al. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator [J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2007, 292(5): F1657-1661.
- [12] Merchant ML, Powell DW, Wilkey DW, et al. Microfiltration isolation of human urinary exosomes for characterization by MS [J]. *Proteomics Clinical Applications*, 2010, 4(1): 84-96.
- [13] Rider MA, Hurwitz SN, Meckes DG. ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23978.
- [14] Chen TS, Arslan F, Yin Y, et al. Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2011, 9(1): 47.
- [15] Yamashita T, Takahashi Y, Nishikawa M, et al. Effect of exosome isolation methods on physicochemical properties of exosomes and clearance of exosomes from the blood circulation [J]. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*, 2016, 98: 1-8.
- [16] Rekker K, Saare M, Roost AM, et al. Comparison of serum exosome isolation methods for microRNA profiling [J]. *Clinical Biochemistry*, 2014, 47(1/2): 135-138.
- [17] 李玉静, 刁振宇, 薛平平, 等. 血清中胎盘来源外泌体的分离与鉴定 [J]. *医学研究生学报*, 2015, 28(6): 632-636.
Li YJ, Diao ZY, Xue PP, et al. Isolation and identification of placental exosomes from maternal serum [J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2015, 28(6): 632-636.
- [18] 王鑫伟, 毛建文. 试剂盒法与差速超速离心法所提血清外泌体的形态学比较 [J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(11): 1837-1841.
Wang XW, Mao JW. The morphological comparison of serum exosome extracting by ultracentrifugation

- and ExoQuick kit[J]. Journal of Clinical and Pathology Research, 2016, 36(11): 1837-1841.
- [19] Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, et al. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers[J]. Kidney International, 2012, 82(9): 1024-1032.
- [20] Musante L, Saraswat M, Duriez E, et al. Biochemical and Physical Characterisation of Urinary Nanovesicles following CHAPS Treatment[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e37279.
- [21] Ban JJ, Lee M, Im W, et al. Low pH increases the yield of exosome isolation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 461(1): 76-79.
- [22] Munich S, Sobovujanovic A, Buchser WJ, et al. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands[J]. Oncoimmunology, 2012, 1(7): 1074-1083.
- [23] Toda Y, Takata K, Nakagawa Y, et al. Effective internalization of U251-MG-secreted exosomes into cancer cells and characterization of their lipid components[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2015, 456(3): 768-773.
- [24] Headland SE, Jones HR, D'Sa ASV, et al. Cutting-Edge Analysis of Extracellular Microparticles using ImageStreamX Imaging Flow Cytometry[J]. Scientific Reports, 2014, 4(14): 5237.
- [25] Zhou H, Yuen PS, Pisitkun T, et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery[J]. Kidney International, 2006, 69(8): 1471-1476.
- [26] Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S, et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy[J]. Colloids and Surfaces B Biointerfaces, 2011, 87(1): 146-150.

收稿日期: 2018-06-01

修回日期: 2018-07-03