

## 三种方法提取血清外泌体的比较研究

黄德发<sup>1</sup>, 陈杰<sup>1</sup>, 杨通<sup>1</sup>, 李正哲<sup>1</sup>, 张文娟<sup>2</sup>, 焦志刚<sup>2</sup>, 钟田雨<sup>1,2</sup>

(1. 赣南医学院第一临床医学院, 江西赣州 341000; 2. 赣南医学院第一附属医院检验科, 江西赣州 341000)

**摘要:** **目的** 比较超速离心法、沉淀法和尺寸排阻色谱法提取血清外泌体的得率和纯度。**方法** 选取8例健康体检受试者血清, 用三种方法提取外泌体, 采用纳米流式检测仪、透射电子显微镜和Pierce BCA蛋白检测试剂盒分别检测外泌体颗粒数、粒径分布、形态特征和蛋白浓度; 分析外泌体颗粒数。外泌体颗粒数和蛋白总量比值、Triton X-100处理前后颗粒数变化来评估外泌体提取的得率和纯度。**结果** 超速离心法、沉淀法和尺寸排阻色谱法提取外泌体粒径均分布在40~150 nm; 透射电子显微镜下均能观察到呈明显茶托状的双层膜结构, 但沉淀法提取的外泌体混有聚乙二醇聚合物及蛋白大颗粒; 蛋白质印迹结果显示三种方法提取的外泌体均表达外泌体标记蛋白; 沉淀法提取的血清外泌体颗粒数高于超速离心法和尺寸排阻色谱法  $[(1.11 \pm 0.07) \times 10^{11} \text{ particle/ml vs } (2.54 \pm 0.04) \times 10^{10} \text{ particle/ml}, (7.51 \pm 0.89) \times 10^{10} \text{ particle/ml}]$ , 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 尺寸排阻色谱法提取外泌体颗粒数高于超速离心法 ( $P < 0.001$ ); 尺寸排阻色谱法提取外泌体纯度高于超速离心法和沉淀法  $[(5.66 \pm 0.45) \times 10^7 \text{ particles}/\mu\text{g vs } (7.65 \pm 0.42) \times 10^6 \text{ particles}/\mu\text{g}, (3.18 \pm 0.45) \times 10^6 \text{ particles}/\mu\text{g}]$ , 超速离心法提取外泌体纯度高于沉淀法, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 超速离心法、沉淀法和尺寸排阻色谱法均能提取出血清外泌体, 超速离心法步骤繁琐, 耗时较长, 提取外泌体得率与纯度较低; 沉淀法操作简单, 耗时短, 提取外泌体得率最高, 但外泌体纯度最低; 尺寸排阻色谱法操作简单, 耗时短, 提取外泌体的纯度最高; 相比而言, 尺寸排阻色谱法显然优于超速离心法和沉淀法。

**关键词:** 外泌体; 超速离心法; 沉淀法; 尺寸排阻色谱法

**中图分类号:** R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2021) 06-139-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2021.06.030

### Comparative Study on Three Methods for Extraction of Serum Exosomes

HUANG De-fa<sup>1</sup>, CHEN Jie<sup>1</sup>, YANG Tong<sup>1</sup>, LI Zheng-zhe<sup>1</sup>, ZHANG Wen-juan<sup>2</sup>, JIAO Zhi-gang<sup>2</sup>, ZHONG Tian-yu<sup>1,2</sup>

(1. the First Clinical Medical College of Gannan Medical College, Jiangxi Ganzhou 341000, China; 2. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical College, Jiangxi Ganzhou 341000, China)

**Abstract:** **Objective** To compare the efficiency and purity of ultracentrifugation, precipitation and size-exclusion chromatography for extracting exosomes from serum. **Methods** Three methods were used to extract serum exosomes. The number of exosomal particles, particle size distribution, morphological characteristics and protein concentration were detected by using nano flow detector, transmission electron microscope and Pierce BCA protein detection kit. Analyzed the number of exosomal particles, the ratio of the number of exosomal particles to total protein and the changes in the number of exosomal particles before or after Triton X-100 treatment to evaluate the yield and purity of exosomes extraction. **Results** The particle size of the exosomes which had been extracted by ultracentrifugation, precipitation and size-exclusion chromatography were all distributed in the range of 40 ~ 150 nm, and the bilayer membrane with obvious saucer-like structure could be observed under transmission electron microscope, but the exosomes extracted by precipitation were mixed with polyethylene glycol polymers and large protein particles. The results of Western blot showed that the exosomes extracted by all three methods had expressed the tag proteins. The number of exosomal particles extracted by precipitation was higher than that of ultracentrifugation and size-exclusion chromatography  $[(1.11 \pm 0.07) \times 10^{11} \text{ particles/ml vs } (2.54 \pm 0.04) \times 10^{10} \text{ particles/ml}, (7.51 \pm 0.89) \times 10^{10} \text{ particles/ml}]$ , the differences were statistically significant (all  $P < 0.05$ ), and the number of exosomal particles extracted by size-exclusion chromatography was higher than that of ultracentrifugation ( $P < 0.001$ ). The purity of exosomes extracted by size-exclusion chromatography was higher than that of ultracentrifugation and precipitation  $[(5.66 \pm 0.45) \times 10^7 \text{ particles}/\mu\text{g vs } (7.65 \pm 0.42) \times 10^6 \text{ particles}/\mu\text{g}, (3.18 \pm 0.45) \times 10^6 \text{ particles}/\mu\text{g}]$ , and the purity of exosomes extracted by ultracentrifugation was higher than that of precipitation, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ).

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81702580); 赣南医学院创新课题 (YC2020-X012)。

**作者简介:** 黄德发 (1994-), 男, 在读硕士研究生, 检验技师, 主要从事外泌体在癌症诊断中应用的研究, E-mail: aa3716340@163.com。

**通讯作者:** 钟田雨 (1982-), 男, 教授, 检验科主任, 主要从事外泌体在癌症诊断中应用的研究, E-mail: zhongtianyuy@gmail.com。

**Conclusion** Ultracentrifugation, precipitation and size-exclusion chromatography can extract the exosomes of Xueqing. Ultracentrifugation is cumbersome, time-consuming and the yield and purity of exosomes are low. The precipitation method is simple and time consuming, and the extraction yield of exosomes is the lowest, but the purity of exosomes its the lowest. Size exclusion chromatography is simple and time-consuming, and the purity of secretes is the highest. In contrast, size-exclusion chromatography is obviously better than ultracentrifugation and precipitation.

**Keywords:** exosomes; ultracentrifugation; precipitation; size-exclusion chromatography

外泌体是一种由细胞分泌的双层膜结构小囊泡,直径40~150 nm,它们广泛存在于血液、尿液、母乳、腹腔积液、羊水、唾液和脑脊液等<sup>[1-2]</sup>。外泌体通过携带蛋白质和核酸等多种生物分子参与细胞间通讯,从而调节机体的生理、病理过程<sup>[3]</sup>。越来越多的研究表明外泌体可以用于疾病的诊断和治疗<sup>[4-5]</sup>。外泌体的分离和鉴定对于研究其生物学及临床应用功能是最基础也是最关键的步骤。目前,外泌体常用的分离方法包括超速离心法、密度梯度离心法、免疫吸附法、沉淀法及尺寸排阻色谱法等<sup>[6-8]</sup>。本研究拟选择超速离心法、沉淀法和尺寸排阻色谱法提取并鉴定血清外泌体,旨在验证采用不同方法提取血清外泌体的得率和纯度,为后续外泌体的研究和应用提供参考依据。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 随机选取2021年1月~3月赣南医学院第一附属医院健康体检者8例,其中男性4例、女性4例,年龄20~40岁,所有体检者体检结果均在参考区间内。使用普通真空采血管采集受试者静脉血10 ml,室温静置30 min使血液凝集。将采集血液在4℃ 1 500 × g离心20 min,取上清,上清液在4℃ 3 000 × g离心15 min,收集上清(血清)每管1 ml, -80℃保存。所有受试者均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 外泌体提取试剂盒(MA0404)(沉淀法)购自大连美仑生物技术有限公司,尺寸排阻色谱柱(EXOSEC1.0-3)购自辽宁润基生物科技有限公司, Millipore超滤管(UFC810096)购自北京华力德科技有限公司, Pierce™ BCA蛋白检测试剂盒(23227)购自 Thermo Fisher Scientific 公司, Triton X-100(T8200)购自北京索莱宝科技有限公司。一抗抗体: CD9, CD63 和 HSP70(ab275018)购自美国 Abcam 公司;二抗抗体: 羊抗兔 IgG 抗体(SA00001-2)购自武汉 Proteintech 公司。贝克曼超速离心机(Optima-Max-T1)购自美国贝克曼库尔特公司, 纳米流式检测仪(N30E)购自厦门福流生物科技有限公司, 透射电子显微镜(JEM1200EX)购自日本 JEOL 公司。

## 1.3 方法

1.3.1 外泌体提取: 超速离心法: 将1 ml血清在4℃ 12 000 × g离心30 min, 弃沉淀吸取上清, 4℃ 110 000 × g离心2 h, 吸弃上清, 沉淀重悬在 PBS

中; 4℃ 110 000 × g离心2 h, 吸弃上清, 沉淀重悬在100 μl PBS中。沉淀法: 按照试剂盒说明书, 取1 ml血清加入0.2 ml提取试剂, 上下颠倒混匀, 4℃孵育30 min, 孵育结束后, 4℃ 10 000 × g离心10 min, 吸弃上清, 沉淀重悬在100 μl PBS中。尺寸排阻色谱法: 按照说明书, 向柱子内加入40 ml PBS冲洗柱子; 柱内上方加入1 ml血清, 继续用PBS洗脱柱子并在下方收集含有外泌体馏分。将收集的外泌体馏分加入超滤管中, 4℃ 2 000 × g离心, 将样品浓缩至100 μl。

1.3.2 透射电子显微镜成像: 取20 μl外泌体样本置于铜网上静置1 min, 滤纸将铜网上的液体吸干; 吸取20 μl 2g/dl醋酸双氧铀染色液室温染色1 min, 滤纸将铜网上的染液吸干, 置于60 W白炽灯下烤3 min, 镜下观察拍照。

1.3.3 外泌体的颗粒与直径: 将已知浓度的二氧化硅纳米颗粒质控球与粒径标准品混合硅球, 在纳米流式检测仪上检测, PBS作为空白对照, 将外泌体样本混匀后进行检测, 得到外泌体的颗粒数与直径。

1.3.4 蛋白印迹实验: 采用Pierce BCA蛋白定量试剂盒进行外泌体蛋白定量, 向外泌体悬液中添加蛋白上样缓冲液, 100℃加热10 min变性; 随后进行12g/dl丙烯酰胺凝胶电泳2 h, 电泳后用转移将蛋白转移至PVDF膜上, 5g/dl脱脂奶粉摇床封闭1 h, 4℃条件下一抗孵育过夜, 第二天加入二抗室温孵育1 h, 在蛋白成像系统中曝光成像。

1.3.5 Triton X-100破膜实验: 外泌体具有双层膜结构囊泡, 容易被去污剂破膜溶解, 而脂质、杂蛋白不易破坏, 通过检测经去污剂处理与未经去污剂处理外泌体颗粒数来评估其纯度。取外泌体10 μl加入10 μl 2g/dl Triton X-100, 另一管10 μl外泌体中加入10 μl PBS作为对照组, 冰上孵育1 h, 纳米流式检测仪检测1min内外泌体颗粒数。外泌体破膜纯度百分比定义为(1- 对照组外泌体颗粒数/Triton X-100处理组外泌体颗粒数) × 100%<sup>[9]</sup>。

1.4 统计学分析 采用GraphPad Prism 8.0软件进行数据分析, 各处理组数据采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析。当 $P < 0.05$ , 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 外泌体粒径分析 见图1。采用纳米流式检

测仪检测外泌体的直径。超速离心法、沉淀法和尺寸排阻色谱法提取的外泌体颗粒直径分别为  $70.26 \pm 0.27$ ,  $73.09 \pm 0.24$ ,  $69.97 \pm 0.75$  nm。两两比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

2.2 外泌体电镜分析 见图2。透射电镜结果显示,

三种方法所提取的外泌体在电镜下均呈一侧凹陷半球形双层膜囊泡, 囊泡直径在 30~200 nm 之间, 但沉淀法提取的外泌体混有聚乙二醇聚合物及蛋白颗粒。

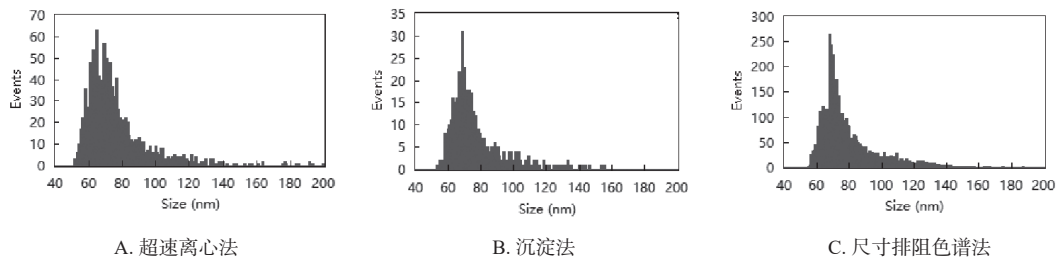


图1 三种方法提取外泌体粒径大小

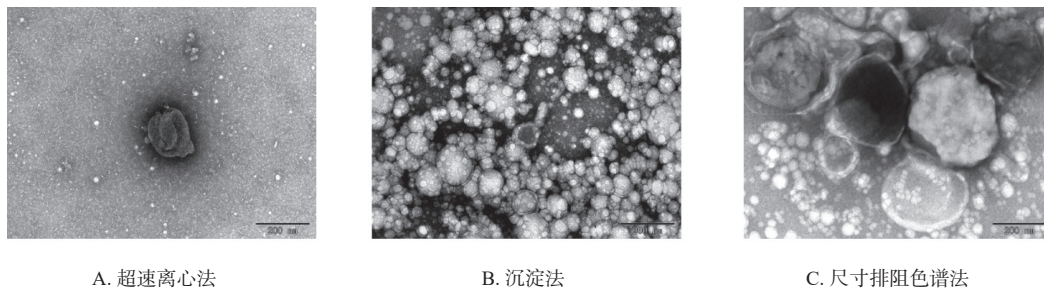


图2 三种方法提取外泌体在透射电镜下的形态

2.3 外泌体蛋白标志物的鉴定 免疫印迹法检测结果表明, 超速离心法、沉淀法和尺寸排阻色谱法提取的血清外泌体均表达外泌体蛋白标志物 CD9, CD63 和 HSP70 (见图3)。

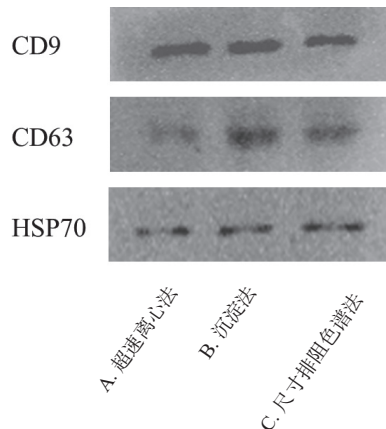


图3 免疫印迹法鉴定外泌体蛋白标志物

2.4 外泌体提取得率及纯度评估 外泌体颗粒数是评价外泌体提取得率的重要指标, 颗粒数越多表明得率越高, 沉淀法提取血清外泌体颗粒数为  $(1.11 \pm 0.07) \times 10^{11}$  particles/ml, 高于超速离心法  $(2.54 \pm 0.04) \times 10^{10}$  particles/ml ( $t=20.79$ ,  $P < 0.001$ ) 和尺寸排阻色谱法  $(7.51 \pm 0.89) \times 10^{10}$  particles/ml ( $t=5.39$ ,  $P=0.014$ ), 尺寸排阻色谱法提取血清外泌体颗粒数高于超速离心法 ( $t=9.62$ ,  $P < 0.001$ ), 差异均有统计学意义。以外泌体颗

粒数与蛋白总量比值表示外泌体的提取纯度, 比值越高表明外泌体纯度越高。尺寸排阻色谱法提取外泌体颗粒数与蛋白总量比值为  $(5.66 \pm 0.45) \times 10^7$  particles/ $\mu$ g, 高于超速离心法  $(7.65 \pm 0.42) \times 10^6$  particles/ $\mu$ g ( $t=18.79$ ,  $P < 0.001$ ) 和沉淀法  $(3.18 \pm 0.45) \times 10^6$  particles/ $\mu$ g ( $t=20.40$ ,  $P < 0.001$ ), 超速离心法提取外泌体颗粒数与蛋白总量比值高于沉淀法 ( $t=4.45$ ,  $P=0.046$ ), 差异均有统计学意义。以 Triton X-100 处理外泌体前后颗粒数变化表示外泌体破膜纯度百分比, 百分比越高表明外泌体纯度越高。尺寸排阻色谱法提取外泌体破膜纯度百分比为  $(87.06 \pm 2.20)\%$ , 高于超速离心法  $(42.13 \pm 2.21)\%$  ( $t=24.92$ ,  $P < 0.001$ ) 和沉淀法  $(26.46 \pm 5.37)\%$  ( $t=18.09$ ,  $P < 0.001$ ), 超速离心法提取外泌体破膜纯度高于沉淀法 ( $t=4.67$ ,  $P=0.042$ ), 差异均有统计学意义。

### 3 讨论

外泌体作为一种新型诊断标志物, 具有快速、高效和经济等多方面优点, 在临床诊断和治疗中具有重要的潜在应用价值。但是由于其形成环境复杂, 直径小等原因, 理想的分离技术一直是限制外泌体研究和应用的关键。

超速离心法是第一种用于外泌体分离的技术, 并且仍然是文献中最常见的技术<sup>[10]</sup>。尽管它被认为是外泌体分离的“金标准”, 但该方法仍然存在



一些缺点<sup>[11-12]</sup>。它费时、费力,并且需要专用的超速离心机,此外,过高的离心速度可能会对外泌体完整性产生影响<sup>[13-14]</sup>。沉淀法是一种广泛用于外泌体分离的方法,这种方法大多数都应用了基于聚乙二醇通过离心沉淀获得外泌体。由于其得率高、操作简单、成本低廉等优点而广受欢迎。尽管沉淀法得率高,但分离的外泌体纯度通常很低,因为几乎所有可溶性颗粒也会被沉淀下来<sup>[15-16]</sup>。近年来,尺寸排阻色谱法被越来越广泛地用作外泌体分离的第二常规选择,它高效、操作简单且耗时短。此外,尺寸排阻色谱法使用重力流原理对外泌体结构及功能损害最小<sup>[17]</sup>。本研究通过超速离心法、沉淀法和尺寸排阻色谱法提取血清外泌体,并比较其得率与纯度。实验结果表明,三种方法均能提取出外泌体,超速离心法步骤繁琐,耗时较长,提取外泌体得率与纯度较低;沉淀法操作简单,耗时短,提取外泌体得率最高,但外泌体纯度最低;尺寸排阻色谱法操作简单,耗时短,提取外泌体得率与纯度最高;相比而言,尺寸排阻色谱法优于超速离心法和沉淀法。

随着对外泌体研究的深入,外泌体分离方法也越来越多,不同的分离方法各有特点。本文从得率和纯度两个方面比较了目前常用的超速离心法,沉淀法和尺寸排阻色谱法提取血清外泌体的优缺点,希望能为后续外泌体的研究和应用提供参考依据。研究人员应该根据样本类型、实验条件等选择合理的分离方法,尽可能地在在外泌体得率和纯度之间找到平衡。

#### 参考文献:

- PEGTEL D M, GOULD S J. Exosomes[J]. Annual Review of Biochemistry, 2019, 88(1):487-514
- JEPPESEN D K, FENIX A M, FRANKLIN J L, et al. Reassessment of exosome composition[J]. Cell, 2019, 177(2): 428-445, e18.
- LATIFKAR A, HUR Y H, SANCHEZ J C, et al. New insights into extracellular vesicle biogenesis and function[J]. Journal of Cell Science, 2019, 132(13): jcs222406.
- XIAO Yongwei, ZHONG Jianing, ZHONG Baoyuan, et al. Exosomes as potential sources of biomarkers in colorectal cancer[J]. Cancer Letters, 2020, 476: 13-22.
- 蒲双双, 李金星. 外泌体在疾病实验诊断和临床治疗中的研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33 (4): 160-164.
- PU Shuangshuang, LI Jinxing. Research progress of exosome in the laboratory diagnosis and clinic treatment of disease [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018,33(4):160-164.
- LI Pin, KASLAN M, LEE S H, et al. Progress in exosome isolation techniques[J]. Theranostics, 2017, 7(3): 789-804.
- YAMAUCHI M, SHIMIZU K, RAHMAN M, et al. Efficient method for isolation of exosomes from raw bovine milk[J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2019, 45(3): 359-364.
- BU Hongchang, HE Dinggeng, HE Xiaoxiao, et al. Exosomes: isolation, analysis, and applications in cancer detection and therapy[J]. Chembiochem, 2019, 20(4): 451-461.
- TIAN Ye, GONG Manfei, HU Yunyun, et al. Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle isolation methods by nano-flow cytometry[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2020, 9(1): 1697028.
- GARDINER C, DI VIZIO D, SAHOO S, et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2016, 5(1): 32945.
- XIAO Yongwei, ZHENG Lei, ZOU Xiaofeng, et al. Extracellular vesicles in type 2 diabetes mellitus: key roles in pathogenesis, complications, and therapy[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2019, 8(1): 1625677.
- 范维肖, 刁艳君, 马越云, 等. 超速离心法与 QIAGEN 膜亲和柱法提取前列腺癌细胞培养上清外泌体的方法学比较 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34 (3):6-9.
- FAN Weixiao, DIAO Yanjun, MA Yueyun, et al. Comparison of ultracentrifugation and membrane based-affinity column methods in exosome isolation from supernatants of prostate cancer cells [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019,34(3):6-9.
- MONGUIÓ-TORTAJADA M, GÁLVEZ-MONTÓN C, BAYES-GENIS A, et al. Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2019, 76(12): 2369-2382.
- MONGUIÓ-TORTAJADA M, MORÓN-FONT M, GÁMEZ-VALERO A, et al. Extracellular-vesicle isolation from different biological fluids by Size-Exclusion chromatography[J]. Current Protocols in Stem Cell Biology, 2019, 49(1): e82.
- KONOSHENKO M Y, LEKCHNOV E A, VLASSOV A V, et al. Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends[J]. BioMed Research International, 2018, 2018: 8545347.
- RIDER M A, HURWITZ S N, MECKES D J. ExtraPEG: A polyethylene Glycol-Based method for enrichment of extracellular vesicles[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 23978.
- GUAN Sheng, YU Hailong, YAN Guoquan, et al. Characterization of urinary exosomes purified with size exclusion chromatography and ultracentrifugation[J]. Journal of Proteome Research, 2020, 19(6): 2217-2225.

收稿日期: 2021-04-20

修回日期: 2021-06-07