



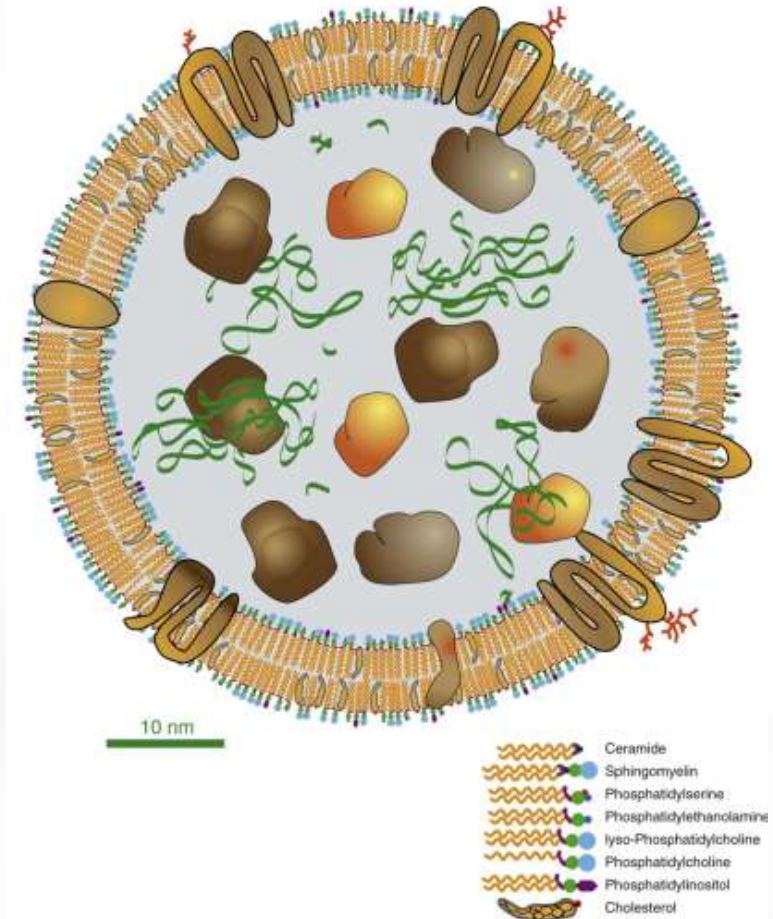
# 外泌体常用提取与检测方法

# 外泌体概览

- 外泌体的简介
- 外泌体提取方法的概述
- 外泌体的检测方法
- 外泌体的生物功能
- 外泌体的研究方向

# 外泌体概念

- 外泌体 (Exosome) 是一种直径约30-200nm的囊泡状结构小体，天然存在于血液、尿液、唾液、母乳和细胞培养基等生物体液中。
- 包括肿瘤细胞在内几乎所有类型的细胞（免疫细胞、神经细胞、干细胞），都可以产生并释放 Exosome。
- Exosome内含有与细胞来源相关的蛋白质、RNA，参与细胞间通讯。
- Exosome在免疫应答、炎症反应、血管生成、凋亡、凝血和废物处理等生理过程发挥关键作用。

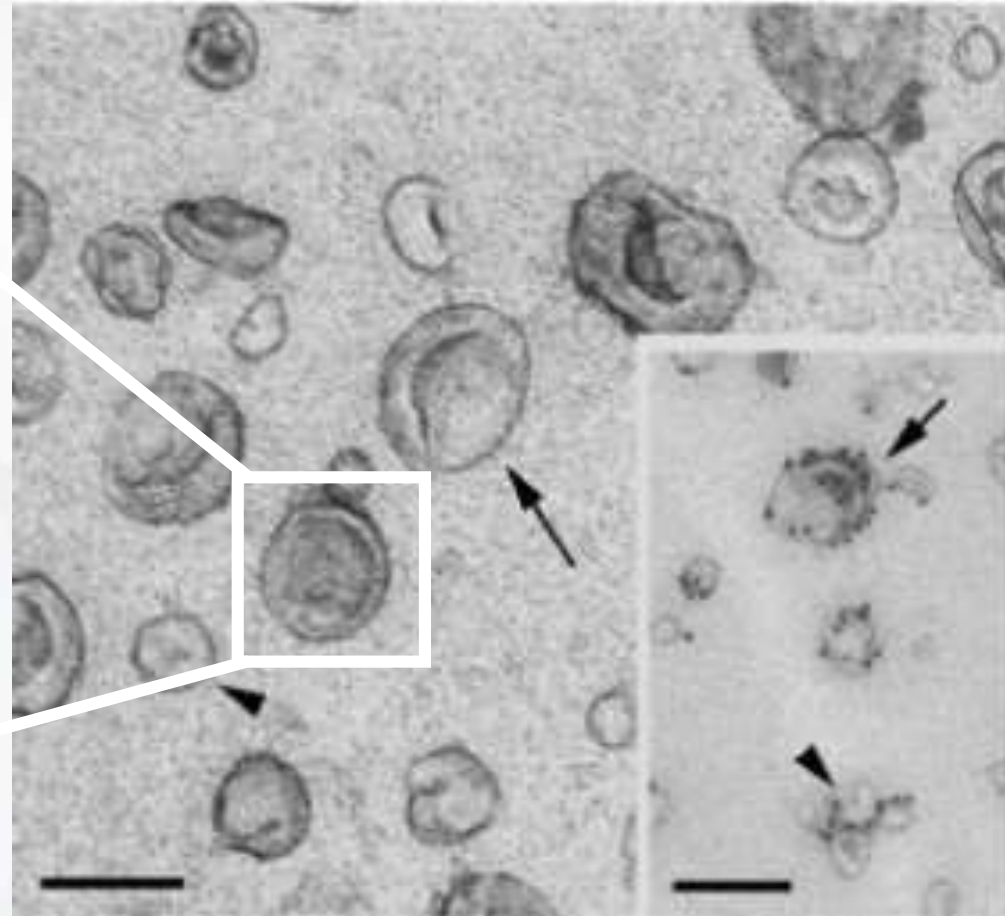


J O'Loughlin A et al., Current gene therapy, 2012, 12(4): 262-274.

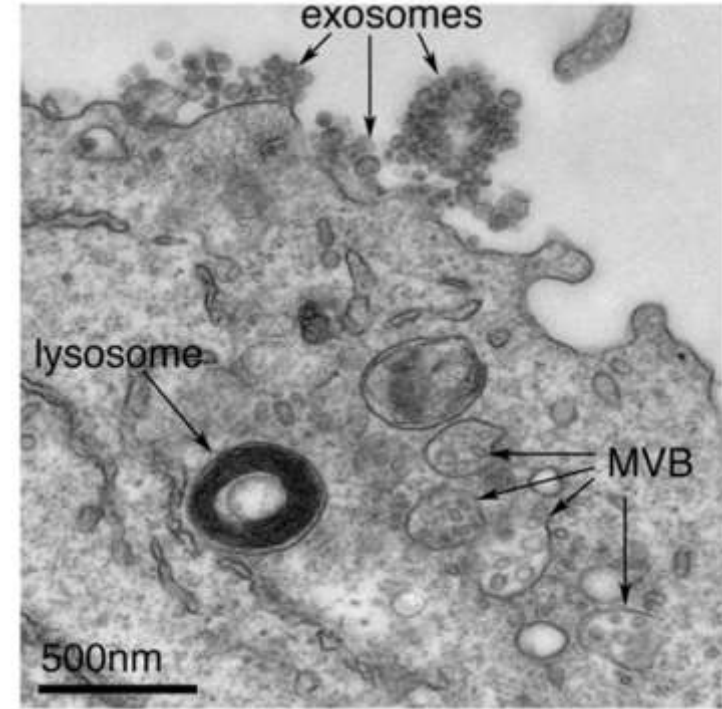
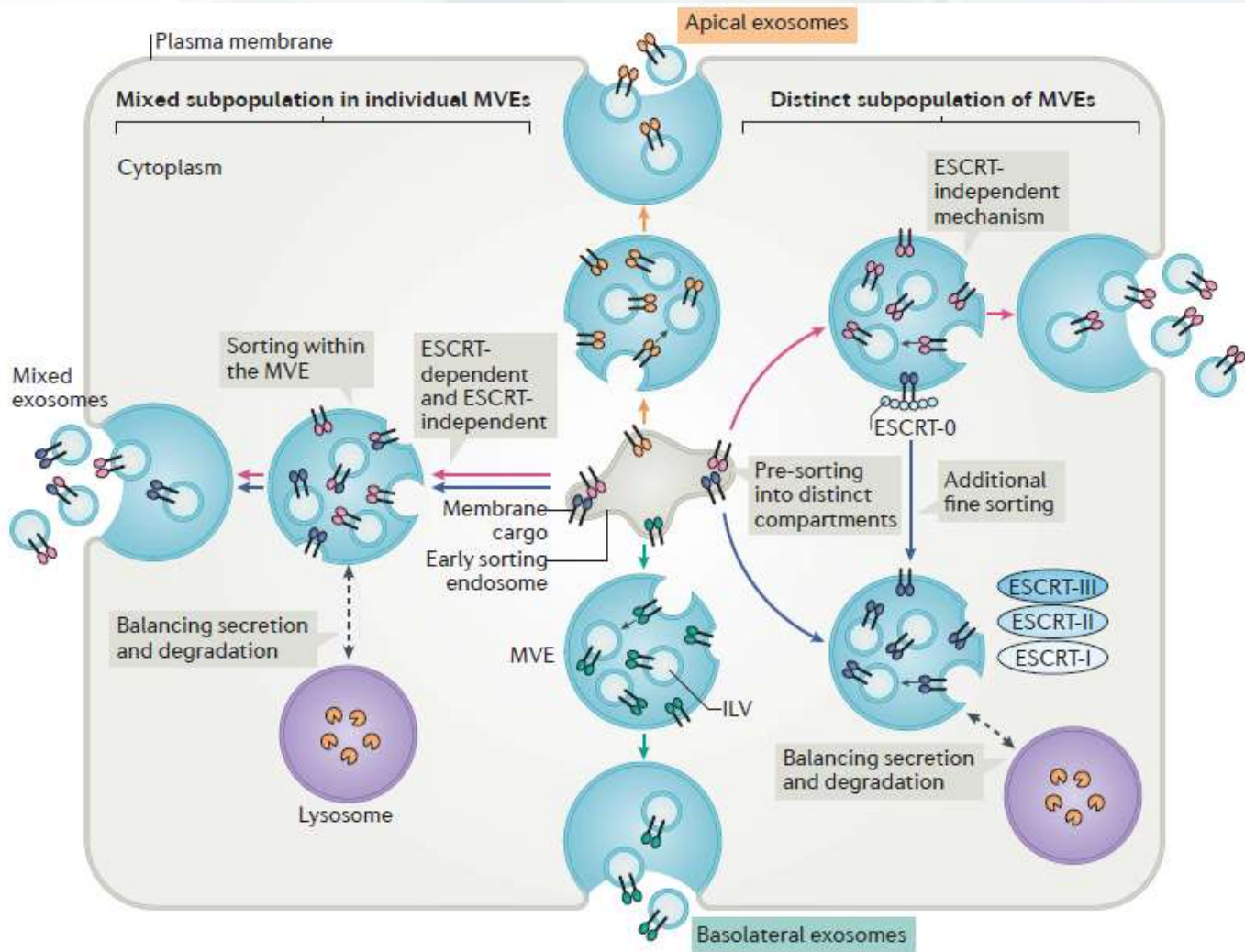
# 外泌体的形态



茶托型



# 外泌体的形成过程



目前，外泌体的形成过程并不是非常清楚，一种认可度比较高的理论认为外泌体是细胞内的多泡体（经过蛋白、核酸等内容物筛选形成的大囊泡）与细胞膜融合后，将其内的膜性小囊泡释放到细胞外，这些膜性小囊泡就是细胞生成外泌体。

# 外泌体概览

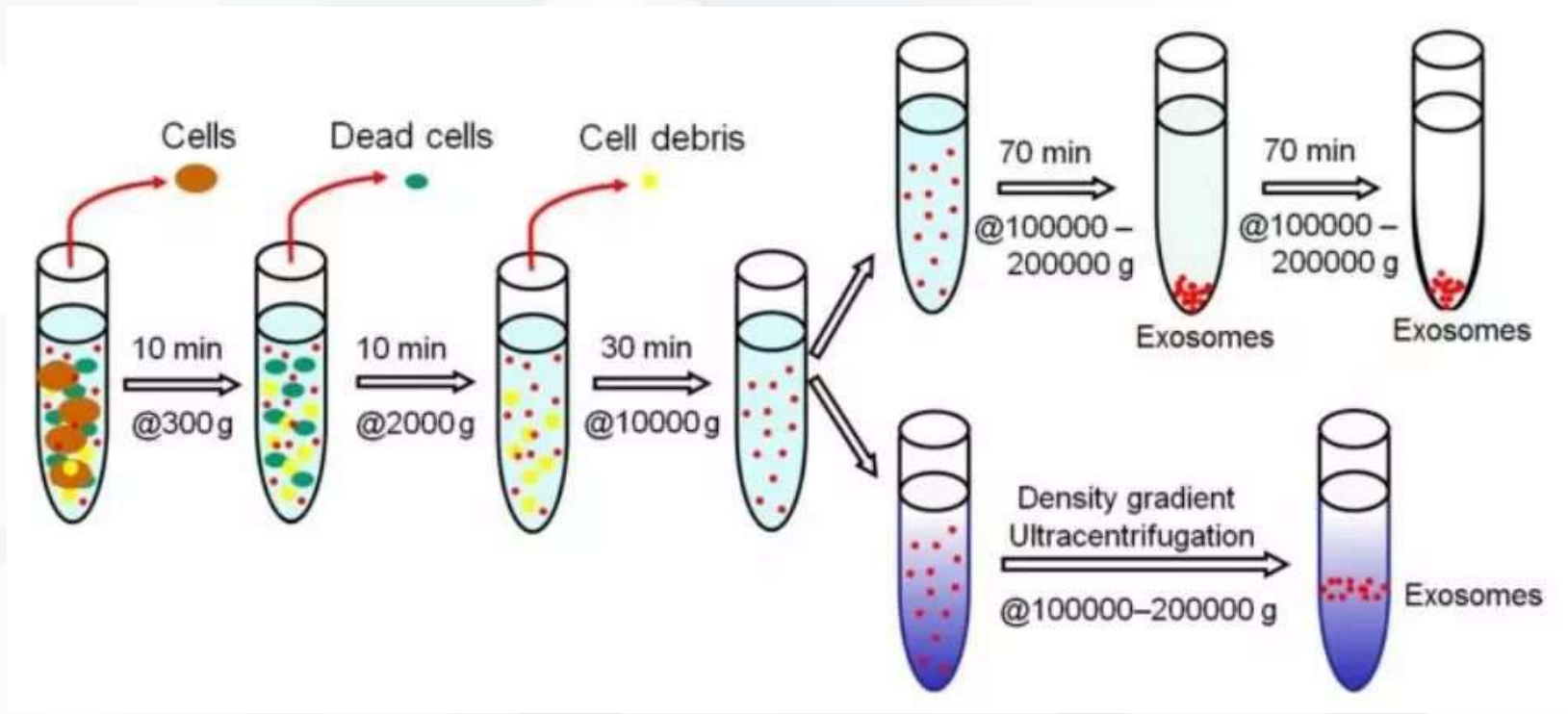
- 外泌体的简介
- 外泌体提取方法的概述
- 外泌体的检测方法
- 外泌体的生物功能
- 外泌体的研究方向

# 外泌体的提取方法

- 超速离心法
- 聚合物沉降法
- 分子排阻法
- 超滤法
- 磁珠特异性捕获法

# 超速离心法

超速离心法是比较早使用的外泌体提取手段，通过高速离心将大小相同的囊泡从样本中沉淀并纯化出来。



细胞培养上清



去掉残留细胞



去掉细胞碎片



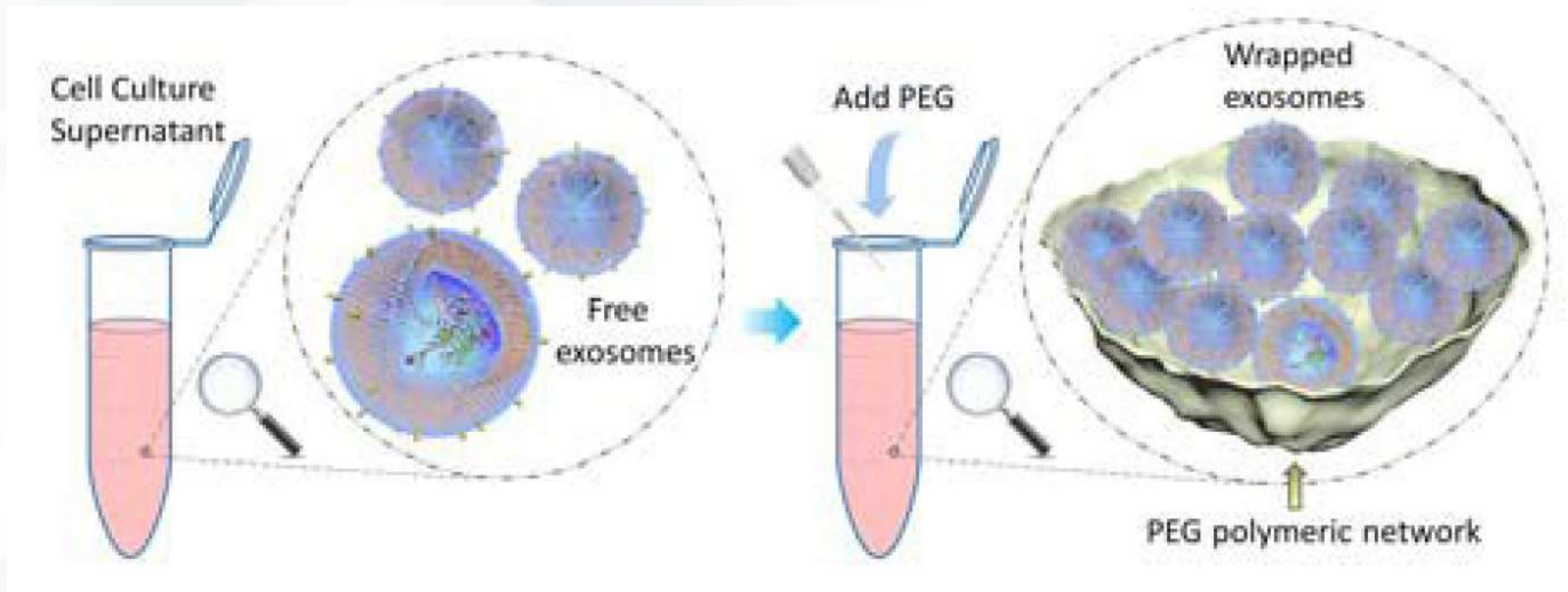
粗纯外泌体



外泌体

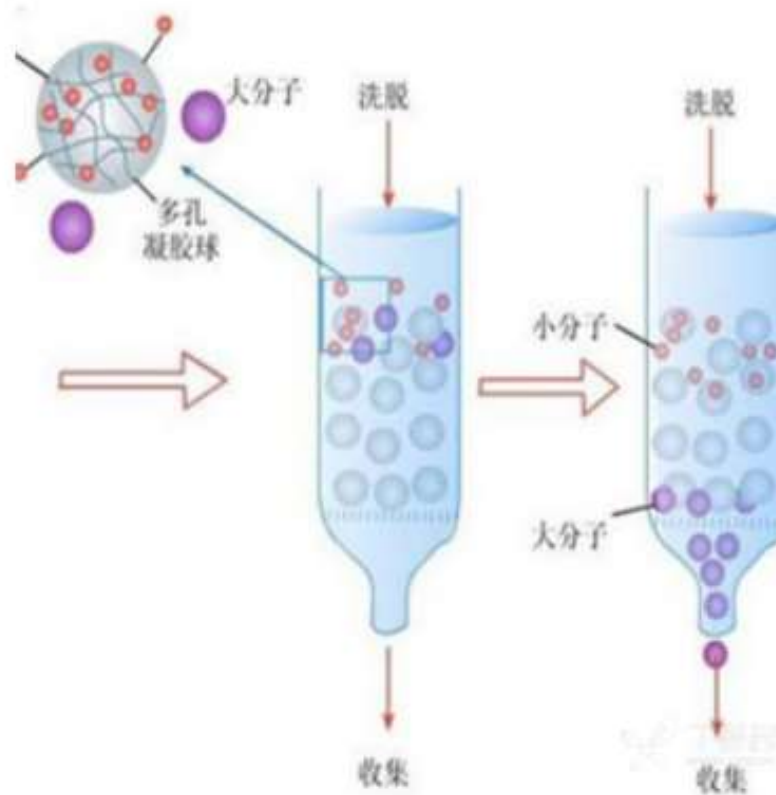
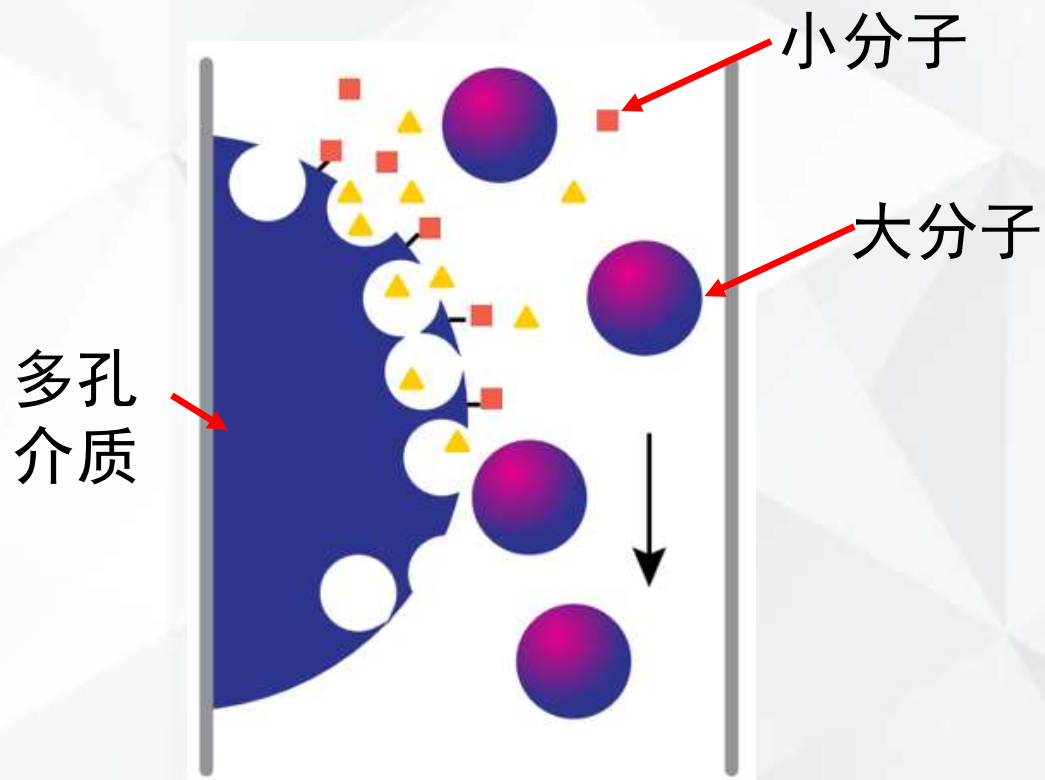
# 聚合物沉降法

- 该方法使用较多的聚合物为聚乙二醇（PEG），PEG可与疏水性蛋白和脂质分子结合共沉淀，早期应用于从血清等样本中收集病毒，现在也被用来沉淀外泌体，
- 其原理可能与竞争性结合游离水分子和PEG本身形成的网状结构有关。在4℃利用PEG孵育后通过过滤或离心即可沉淀、回收外泌体。



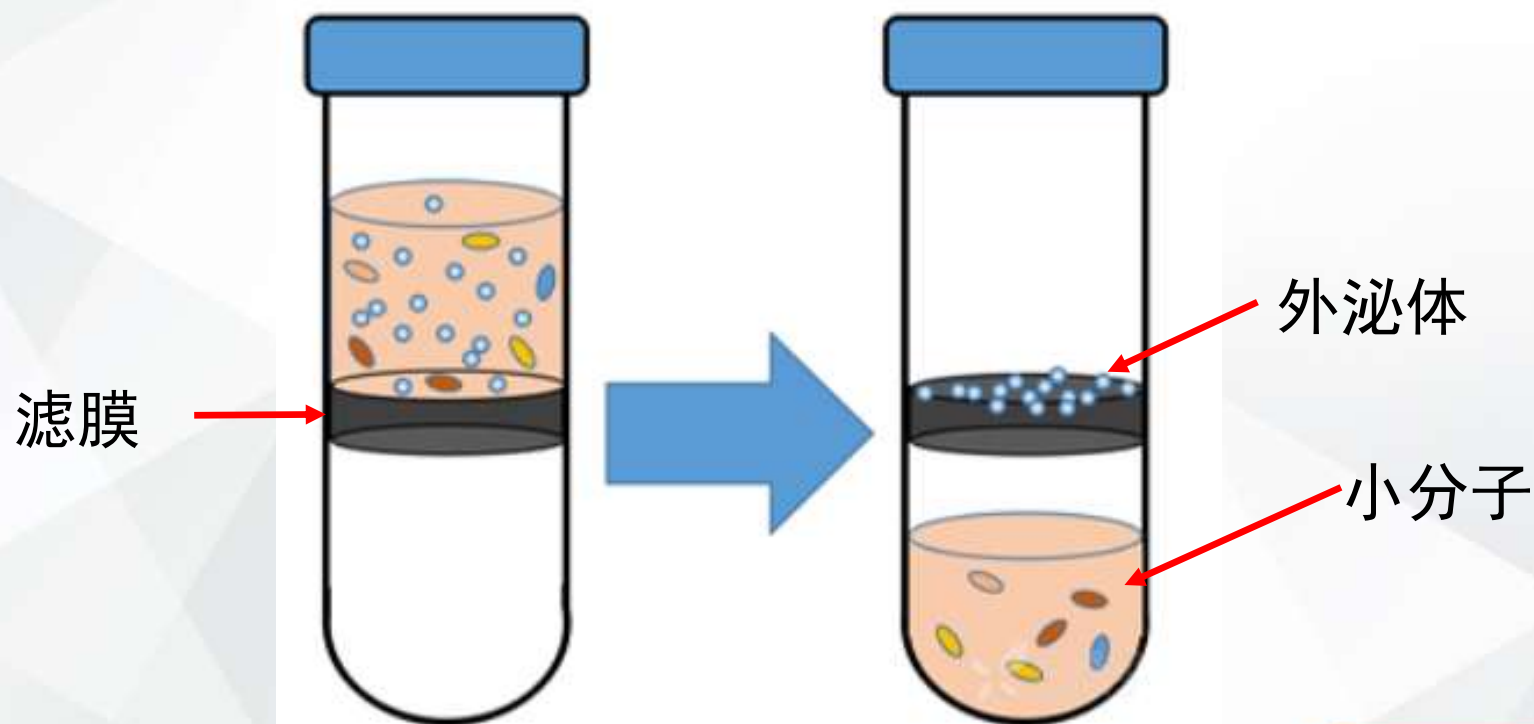
# 层析法

采用尺寸排阻层析的原理按照分子粒径不同进行分段分离的方法。将生物样品流经具有固定孔隙的介质，吸附粒径较小的分子如蛋白、脂类等，而较大粒径的分子或颗粒不能进入孔隙。在缓冲液的作用下，较大粒径的囊泡（外泌体）流速快，在特定的阶段会被洗脱出来进入样品收集管，成为实验样品。而小分子具有较长的保留时间，最后被洗脱出来。

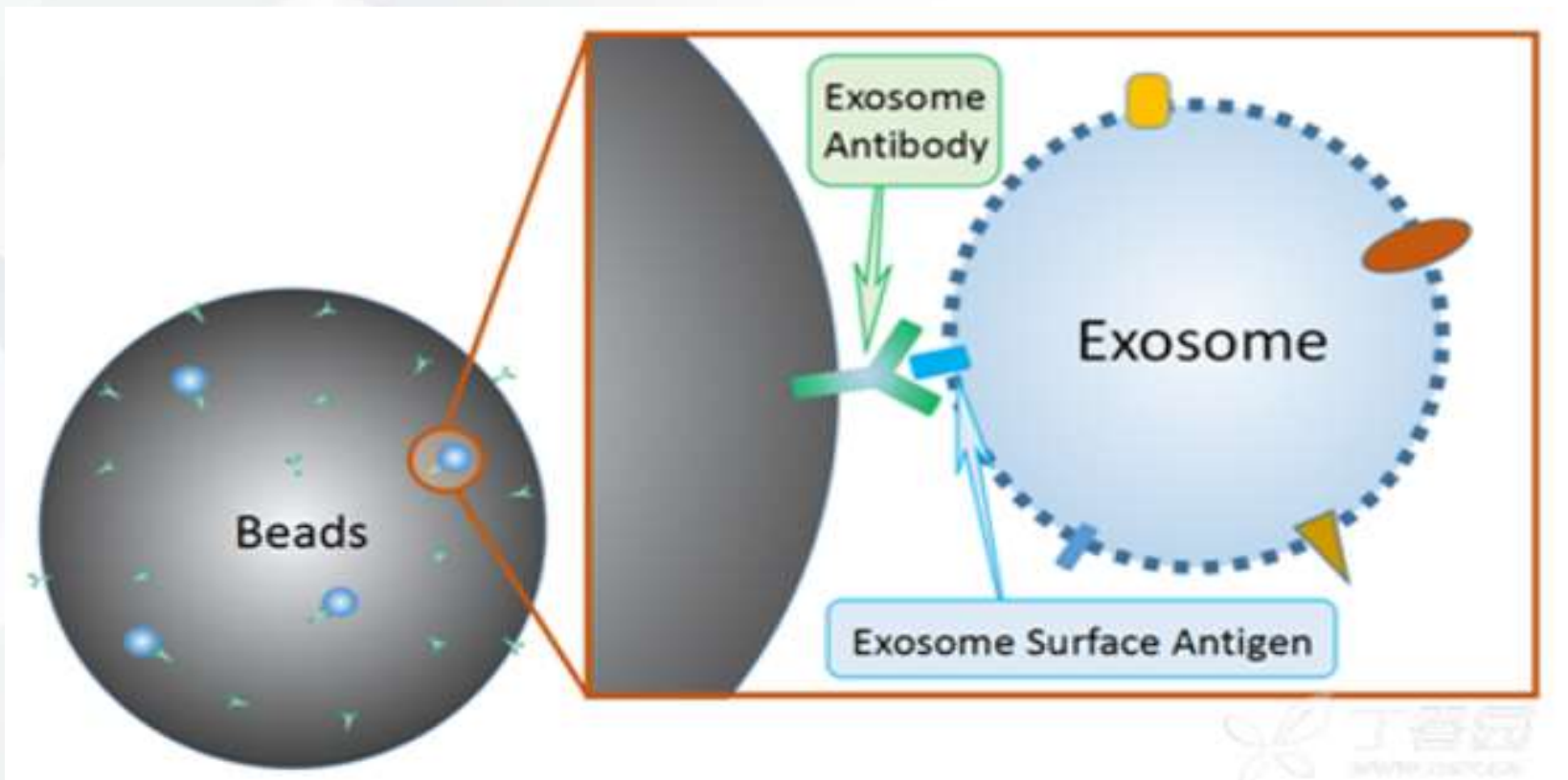


# 超滤法

- 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30~200nm，大于一般蛋白质，我们用孔径小于200nm 的超滤膜低速长时间离心就可以分离样本中的外泌体。
- 这种方法的形式并不是唯一的，可以灵活的搭配各种滤膜得到相对较纯的外泌体。



- 外泌体表面带有许多特殊的膜蛋白质，如CD9、CD63、CD81、ANNEXIN、TSG101等，可以用作分离外泌体的特异性标记。利用相应抗体与这些蛋白质间的特异性相互作用，用包被抗体的磁珠等介质与外泌体囊泡孵育后结合，即可将外泌体特异性的吸附并分离出来，同时也可以用于外泌体的富集。
- 不同外泌体上的标记物丰度也不同，可以通过特定的抗体组合从样本中捕获不同类型的外泌体，进行选择性的分离。



# 不同提取方法间的比较

	超速离心法	免疫吸附法	聚合物沉淀法	超滤/分子排阻法
方法	利用分子的大小比重	运用磁珠法特异性吸附外泌体表面抗原进行免疫分离	聚合物与外泌体相互作用	利用滤膜/介质孔径大小进行分离
优点	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 样品处理量大</li> <li>• 可使用的样品种类较多</li> <li>• 成本低</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 操作简单</li> <li>• 时间较短</li> <li>• 纯度高</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 操作简单</li> <li>• 时间短</li> <li>• 不需要特殊的仪器</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 操作简单</li> <li>• 耗时较短</li> <li>• 结构保持相对完整</li> </ul>
缺点	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 操作步骤较多</li> <li>• 耗时长</li> <li>• 杂质较多</li> <li>• 通量较低</li> <li>• 需要超速离心机</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 回收效果依赖抗体性能</li> <li>• 成本较高</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 杂质较多</li> <li>• 不同的样品种类所使用的方法不同</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 与外泌体相同大小的物质会被一同留下</li> <li>• 有可能堵塞滤膜</li> <li>• 纯度较低</li> <li>• 产量不高</li> </ul>

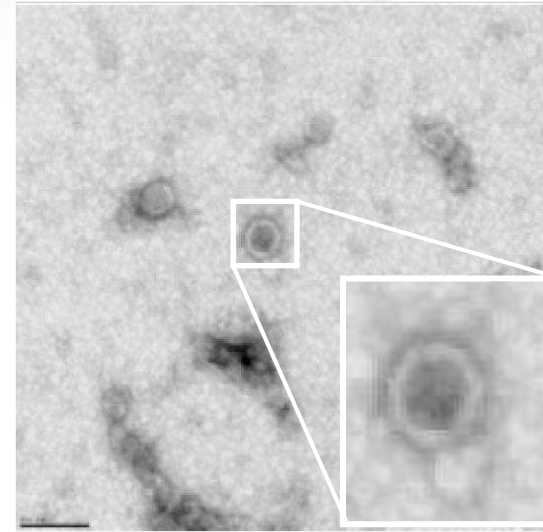
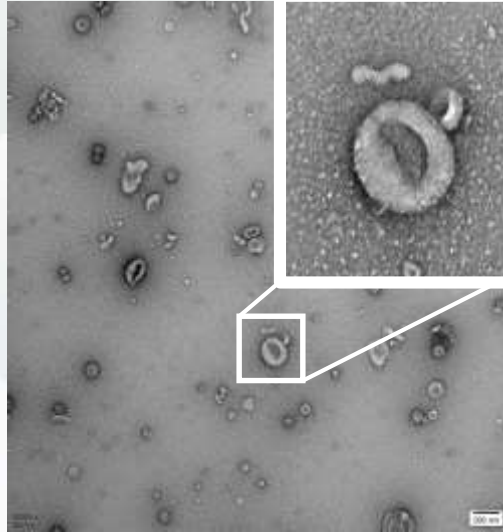
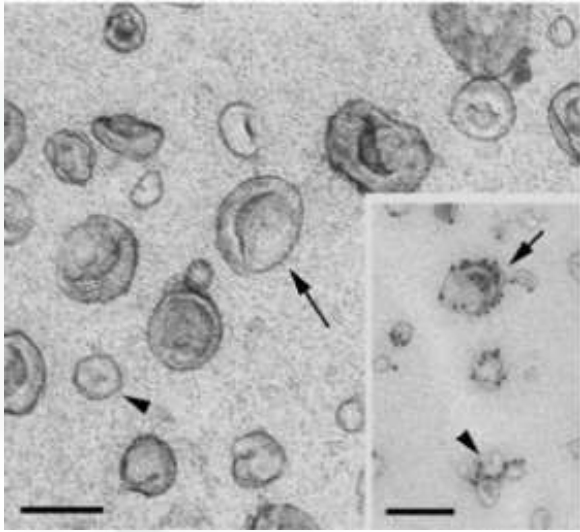
# 外泌体概览

- 外泌体的简介
- 外泌体提取方法的概述
- 外泌体的检测方法
- 外泌体的生物功能
- 外泌体的研究方向

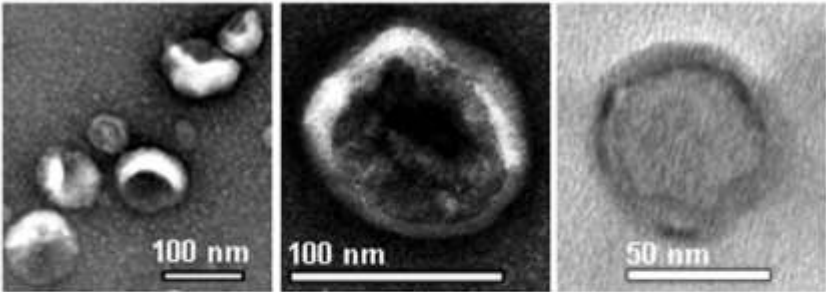
# 外泌体的检测方法

- 电镜检测（多为透射电镜）
- Western Blot
- 粒径分析

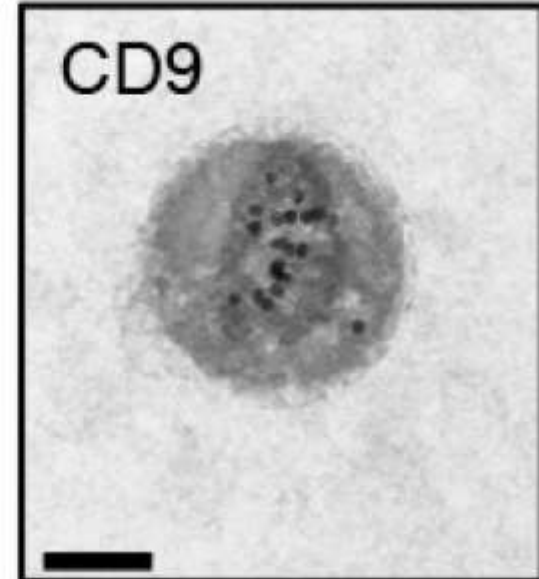
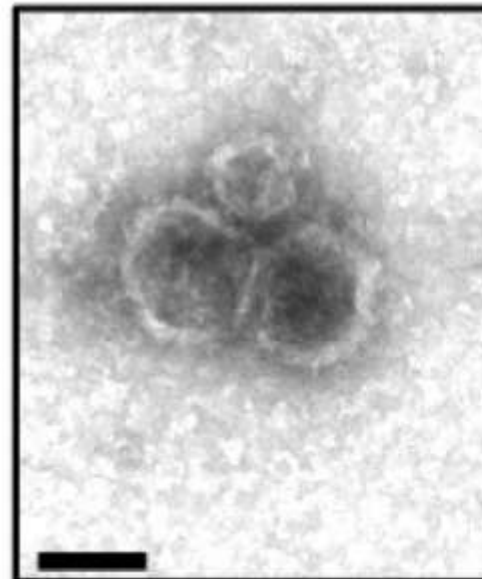
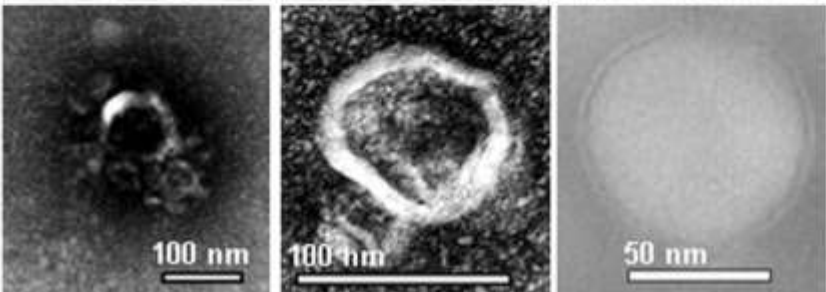
# 外泌体—透射电镜检测



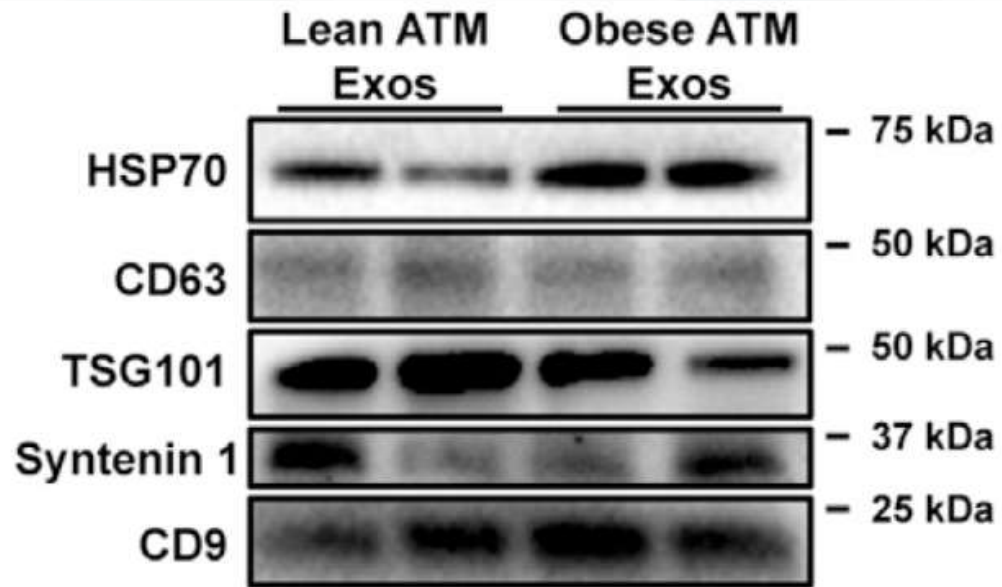
MDA-MB-231 cell



Serum



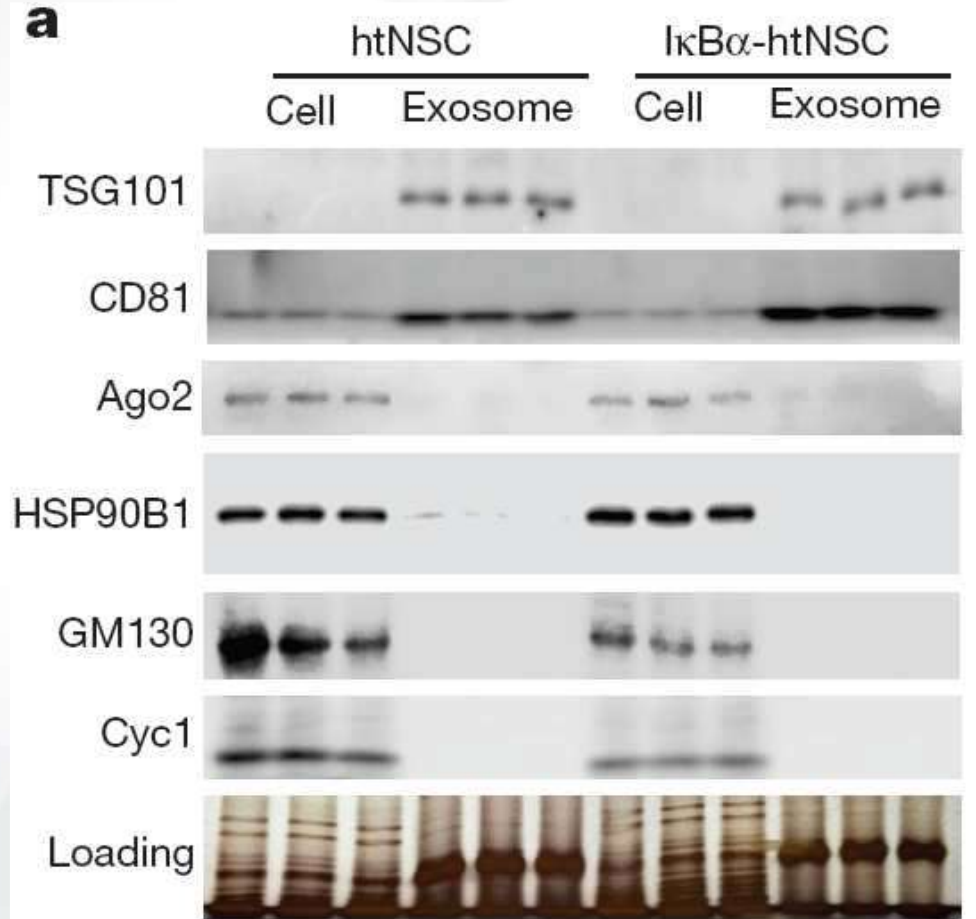
根据数十篇外泌体相关文献的WB检测数据显示，外泌体检测较多的蛋白主要有CD9、CD63、TSG101、CD81、Alix、HSP70、Syntenin等，还有少量蛋白也有在文献中出现过，比如HSP90、RPL5等。



脂肪巨噬细胞来源的外泌体检测

Cell. 2017 Oct

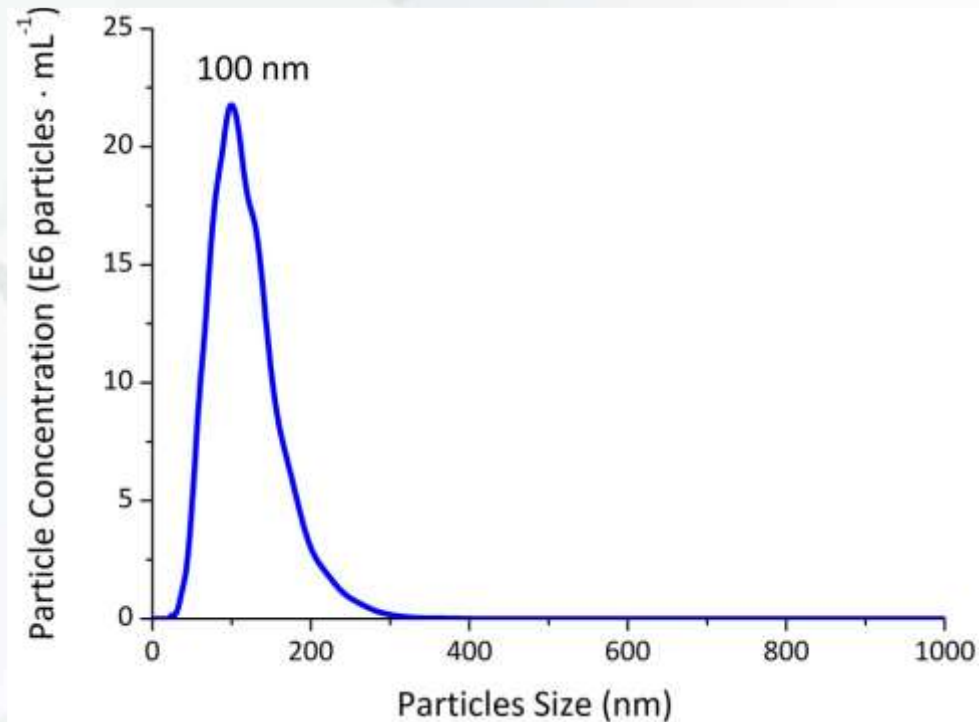
# Western Blot检测



神经干细胞及其来源的外泌体检测

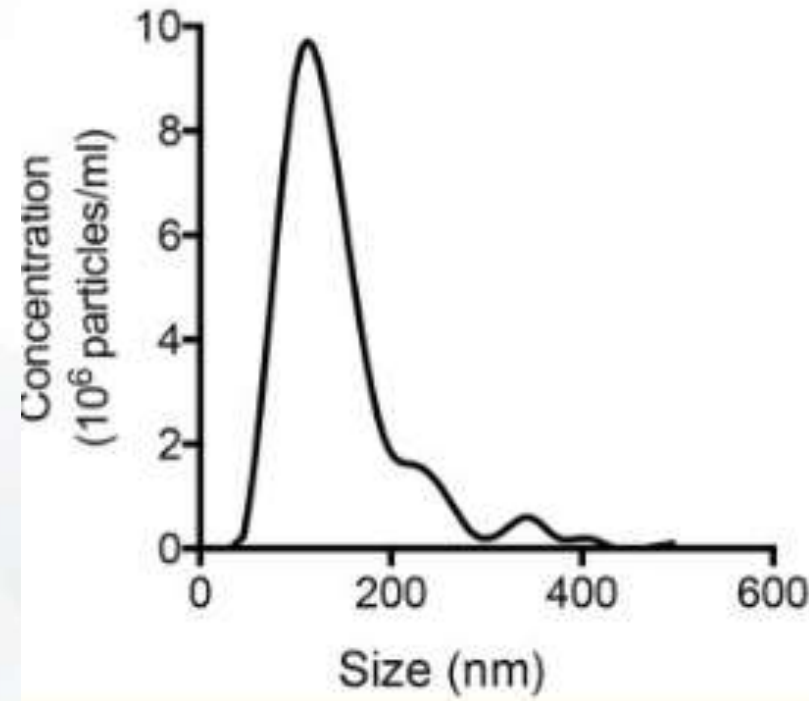
Nature. 2017 Aug

- 外泌体粒径分析方法一般采用纳米颗粒跟踪分析 (Nanoparticle tracking Analysis, NTA), 其原理是对每个颗粒的布朗运动进行追踪和分析, 结合 Stokes-Einstein 方程式计算出纳米颗粒的流体力学直径和浓度。
- 外泌体检测的粒径峰值一般约为100 nm。
- 不同来源的外泌体和不同的提取方法可能会使粒径分析结果有微小偏移。



HeLa cell culture PEG-based approach.  
supernatant by optimized

Weng et al. Analyst (2016)



Exosome secretion in HepG2 cells

Yang et al. Molecular Cancer (2019) 18:78

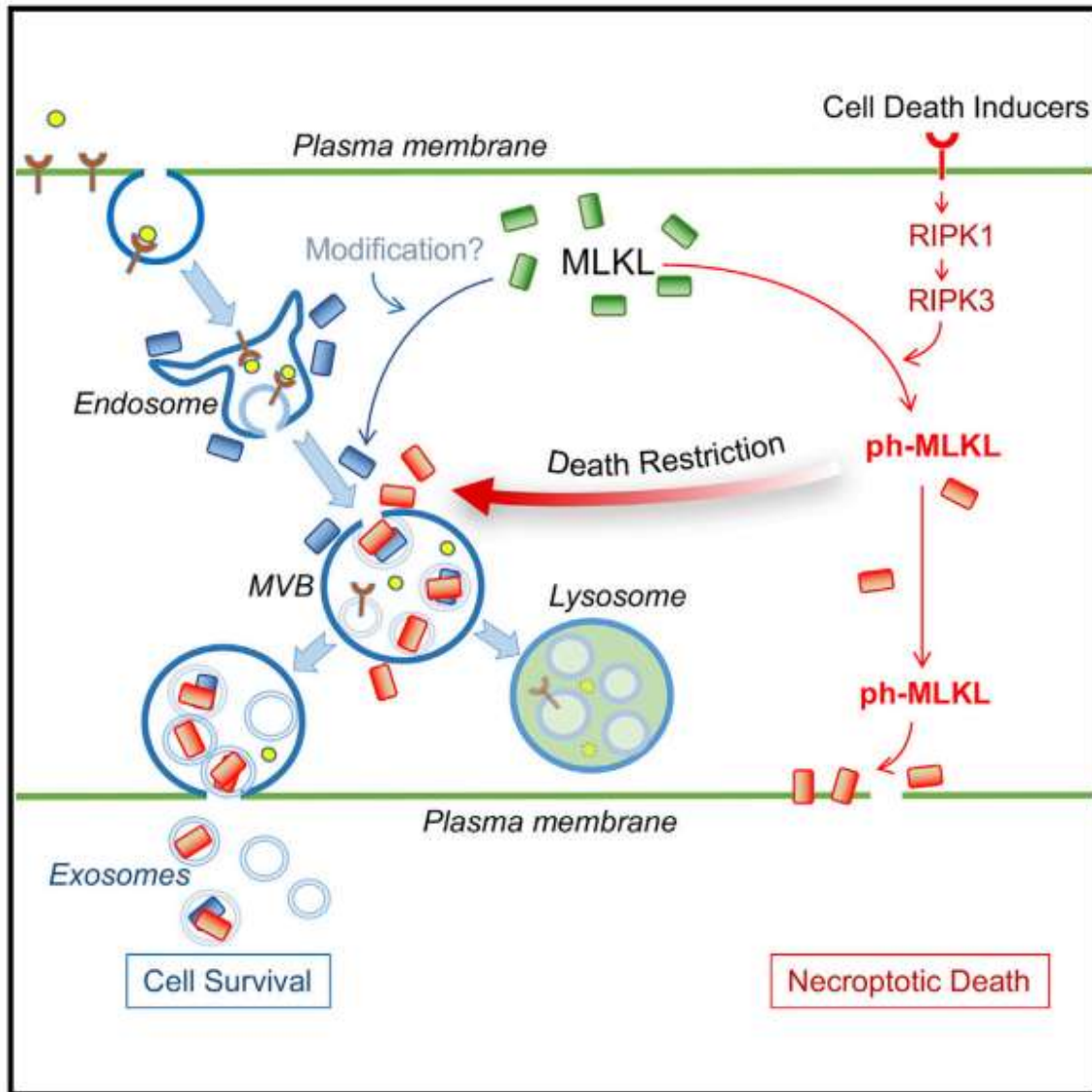
# 外泌体概览

- 外泌体的简介
- 外泌体提取方法的概述
- 外泌体的检测方法
- 外泌体的生物功能
- 外泌体的研究方向

# 外泌体的生物功能

- 细胞的自我调节
- 信号传导和分子转移
- 参与生理病理过程

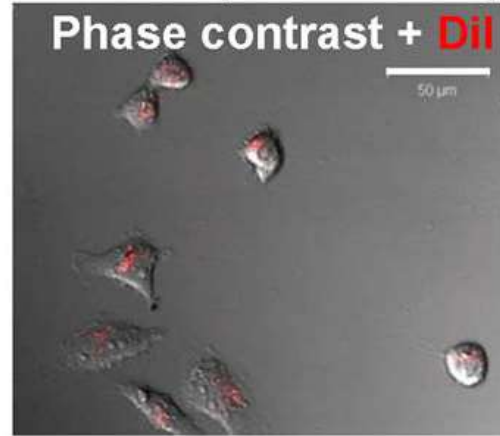
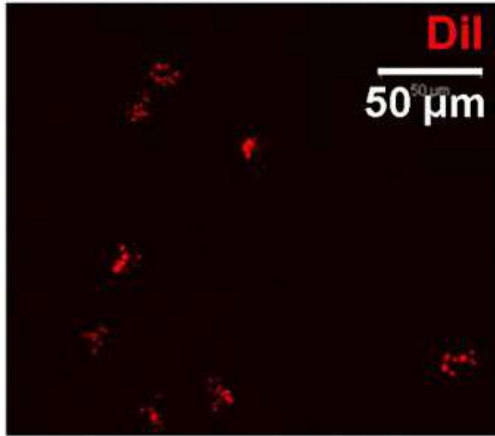
# 细胞的自我调节



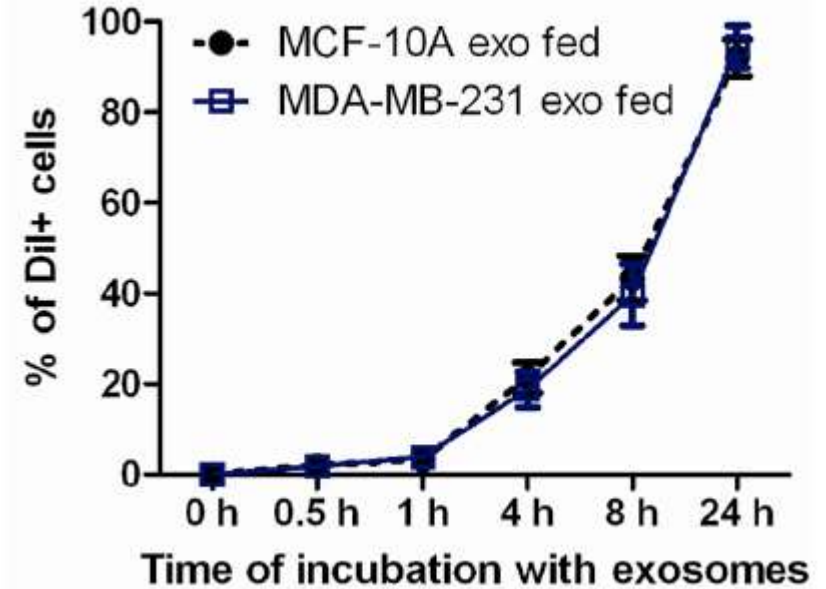
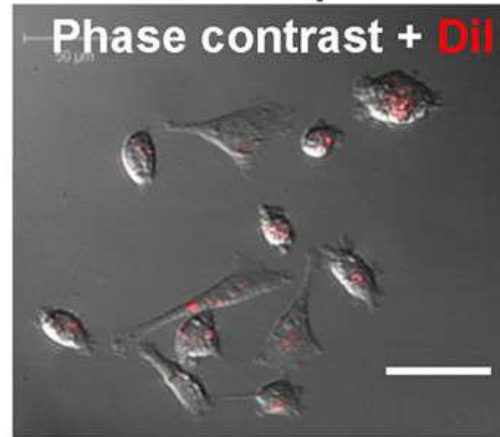
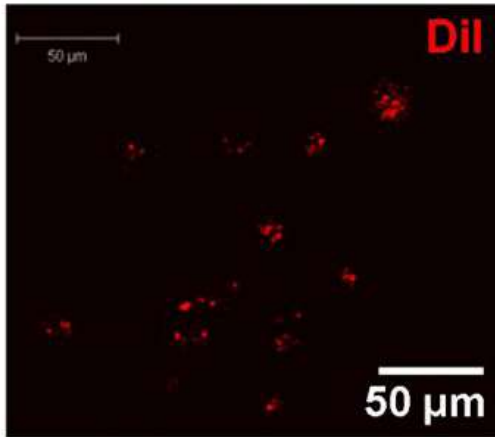
当MLKL被RIPK3磷酸化以后，磷酸化的MLKL会引起细胞的死亡。在正常状态下，MLKL本身会促进细胞内多胞体的生成和运输，并产生外泌体。这个过程中并不需要RIPK3。但RIPK3可以促进MLKL产生外泌体的进程，使其进程加快，将引发细胞死亡的磷酸化MLKL装入囊泡，并分泌到细胞外，细胞可能因此逃脱死亡的命运。

# 信号传导和分子转移

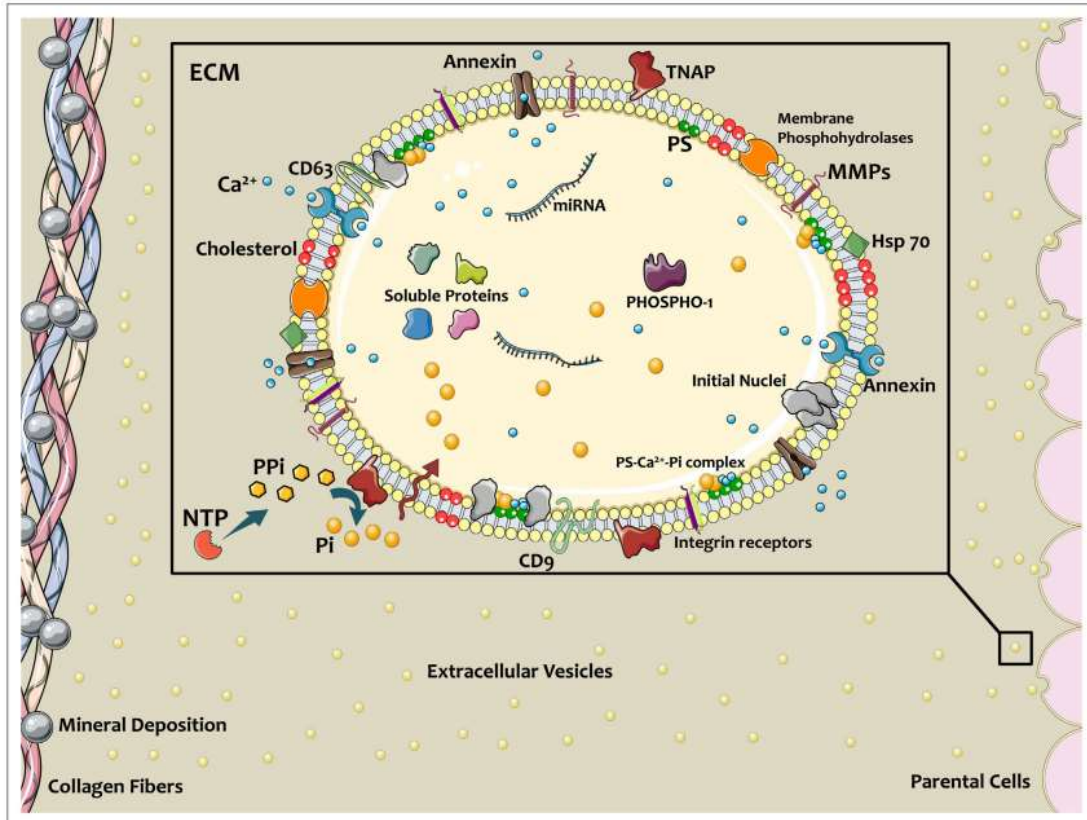
HMVEC + MCF-10A exosomes (Dil-labeled)



HMVEC + MDA-MB-231 exosomes (Dil-labeled)



MCF-10A或MDA-MB-231分泌的外泌体使用Dil染料标记，将标记后的外泌体与HMVEC细胞时进行孵育，并检测荧光情况。在被孵育的HMVEC细胞中检测到了荧光，并且随着孵育时间的延长，HMVEC细胞中荧光细胞的比例上升。



细胞外囊泡（包含外泌体）钙化形成原理



细胞外囊泡（包含外泌体）参与动脉硬化的形成

在动脉粥样硬化糖尿病患者中，瓣膜间质细胞和巨噬细胞释放细胞外囊泡（包含外泌体），释放的外泌体中包含特定促进矿化的物质，这些钙化的外泌体促使动脉血管硬化。

# 外泌体概览

- 外泌体的简介
- 外泌体提取方法的概述
- 外泌体的检测方法
- 外泌体的生物功能
- 外泌体的研究方向

# 外泌体的研究方向

## ● 基础性研究

- 外泌体的形成过程和机理
- 外泌体的生物学功能
- 外泌体介导细胞间信号传导的过程和机制

## ● 疾病诊断的Biomarker研究

- 外泌体内容物（核酸、蛋白等）的组成
- 不同生理状态下的外泌体数量及状态

## ● 药物载体的研究



谢谢!

[www.transgen.com.cn](http://www.transgen.com.cn)

北京全式金生物技术有限公司

