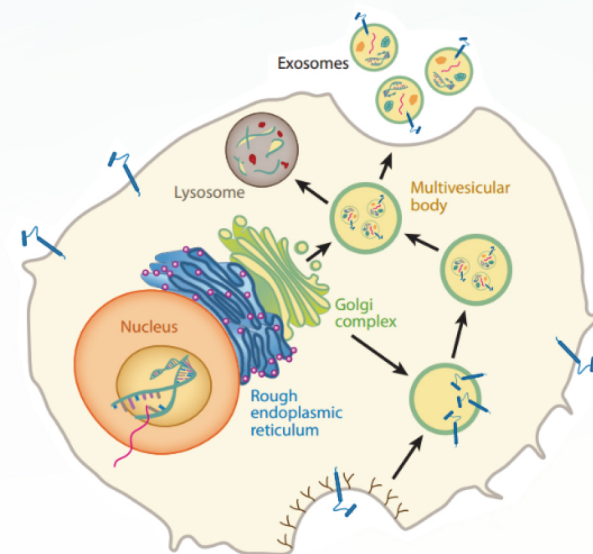


外泌体 miRNA 研究 技术手册



北京吉康医学科技有限公司

公司总部：北京市北京经济开发区荣华南路1号院6号楼

实验基地：天津市武清区武清开发区创业总部基地B座

市场部联络邮箱：genecomeservice@163.com

吉康医学公司官网地址：www.genecome.cn

北京吉康医学科技有限公司

www.genecome.cn

目录 >>

1 外泌体简介	01
2 外泌体来源及内含物	01
3 外泌体鉴定	02
4 外泌体主要功能	02
5 外泌体-small RNA (microRNA / miRNA)	03
6 附注	04
[1] 外泌体富集方法 (试剂盒)	04
[2] 外泌体富集方法 (超高速离心)	04
[3] 电子显微镜检测外泌体形态方法	04
[4] Western Blot 检测外泌体标志物方法	04
[5] Agilent 2100 检测外泌体 RNA 特性	05
7 吉康特色	06
8 外泌体送样须知	06
8.1. 血清样品	06
8.2. 血浆样品 (不能用肝素抗凝)	07
8.3. 细胞上清	07
9 常见问题	08
[1] 哪些样品类型适合开展外泌体 small RNA 测序?	08
[2] 外泌体的分离采用哪一种技术更好?	08
[3] 能否进行外泌体中 mRNA 或 lncRNA 的检测?	08

1. 外泌体简介

外泌体 (exosomes) 是一种能被机体内大多数细胞分泌的直径大约为 30 ~ 150 nm 的具有脂质双层膜的微小膜泡 (图1)。它广泛存在并分布于各种体液中, 携带和传递重要的信号分子, 形成了一种全新的细胞间信息传递系统, 影响细胞的生理状态并与多种疾病的发生与进程密切相关。2013年, 发现细胞囊泡运输的调节机制的科学家们, 荣获了当年诺贝尔生理学或医学奖。作为人体内的一类重要囊泡, 外泌体已成为科研热点 (表 1)。

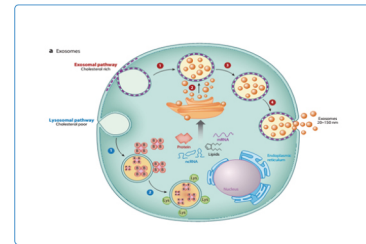


图 1 外泌体的形成与分泌

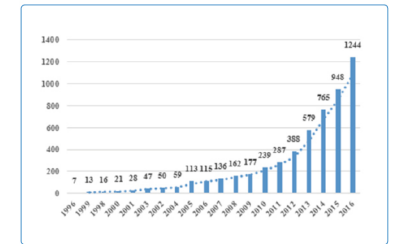


表 1 近年来发表的外泌体文章数量分布

2. 外泌体来源及内含物

几乎所有类型的细胞都可以分泌外泌体, 同时外泌体也广泛存在于体液中, 包括血液、眼泪、尿液、唾液、乳汁、腹水等。目前研究发现外泌体中富含核酸 (microRNA、lncRNA、circRNA、mRNA、tRNA 等)、蛋白、胆固醇等。外泌体的表面 marker 主要有 CD63、CD81、CD9、TSG101、HSP27 等 (图 2)。

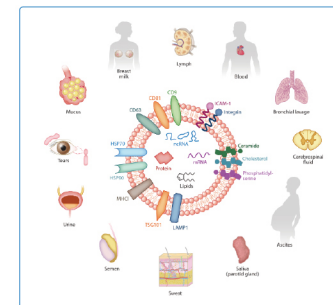


图 2 外泌体的来源及内含物

参考文献:

Ibrahim A, Marbán E. Exosomes: Fundamental Biology and Roles in Cardiovascular Physiology [J]. Annual Review of Physiology, 2016, 78(1): 67-83.

3. 外泌体鉴定

目前对于外泌体的鉴定主要有四种方法：透射电子显微镜（TEM）、Nanosight、Western Blot、流式细胞术（图3）。

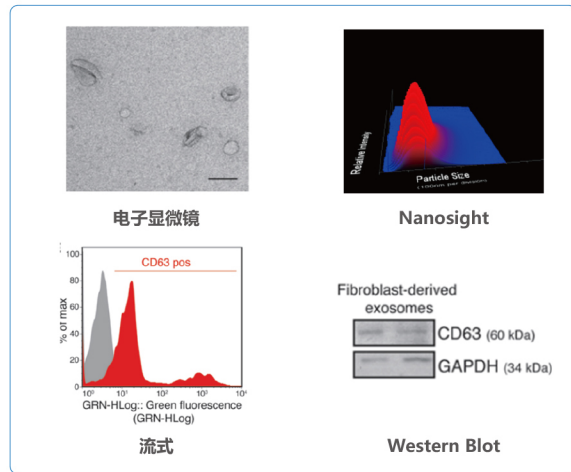


图3 外泌体鉴定方法

参考文献:

Bang C, Batkai S, Dangwal S, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy [J]. Journal of Clinical Investigation, 2014, 124(5): 2136-46.

4. 外泌体主要功能

外泌体内含有大量蛋白质、脂质、DNA、RNA，可调节多种生理或病理反应，包括有血管生长、肿瘤细胞侵袭与转移、免疫应答等。由于 miRNA 在基因表达调控上有着重要作用，exosome 中的 miRNA 受到最多的关注。外泌体 miRNA 通过循环囊泡传递信息，被认为是细胞间信号交流的第三种途径。除了 miRNA 外，研究表明外泌体中的 circRNA、lncRNA 和蛋白质也参与细胞内的信号调控。

- 外泌体与肿瘤
- 外泌体与干细胞
- 外泌体与心血管疾病
- 外泌体与免疫疾病
- 外泌体与神经疾病

5. 外泌体-small RNA (microRNA / miRNA)

miRNA 是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA，它本身不具有开放阅读框架（ORF），不编码蛋白质，其长度约 20 - 25 个核苷酸。近来的研究表明，miRNA 存在于体液中的外泌体内，进行远距离的信息传递，在细胞分化、生物发育及疾病发生与发展过程中具有巨大作用。

外泌体-miRNA 研究技术 (吉康提供)

- Agilent 芯片
- Affymetrix 芯片
- small RNA 测序
- PCR-Array

应用案例

通过二代测序技术发现 miR-21 在肿瘤相关脂肪细胞和成纤维细胞的 exosome 中的表达量明显高于卵巢癌细胞。肿瘤相关的脂肪细胞和成纤维细胞中的 miR-21 可以转移到卵巢癌细胞中，miR-21 通过靶基因 APAF1 来抑制卵巢癌细胞的凋亡并产生化疗抗性。此外，转移性卵巢癌细胞可通过相邻基质细胞的外泌体递送 miR-21 来获得（图4）。

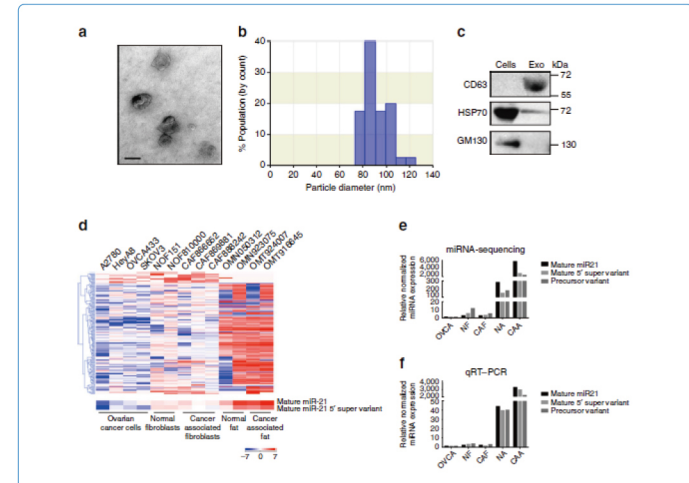


图4 miR-21 在肿瘤相关的脂肪细胞分泌的外泌体上调表达

参考文献:

Yeung CLA, Co NN, Tsuruga T, et al. Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1 [J]. Nature communications, 2016, 7: 11150.

6. 附注

[1] 外泌体富集方法（试剂盒）

A. 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>

B. SBI试剂盒提取步骤：

<https://www.systembio.com/microrna-research/exoquick-exosomes/literature>

[2] 外泌体富集方法（超高速离心）

离心法是目前外泌体提取最常用的方法。简单来说，收集细胞培养液以后依次在 300 g、2,000 g、10,000 g 离心去除细胞碎片和大分子蛋白质，最后 100,000 g 离心得到外泌体。由于样本性质和来源不一，目前仍没有一种方法能兼顾得率、纯度及生物活性。目前吉康医学经过多次优化，总结出一套可获得较高外泌体得率和纯度的流程，如有需求请联系 15201427423 索取。

[3] 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 μ L 的 PBS 中；

[2] 吸取样品10 μ 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 μ 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。

[4] 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（图 5）。

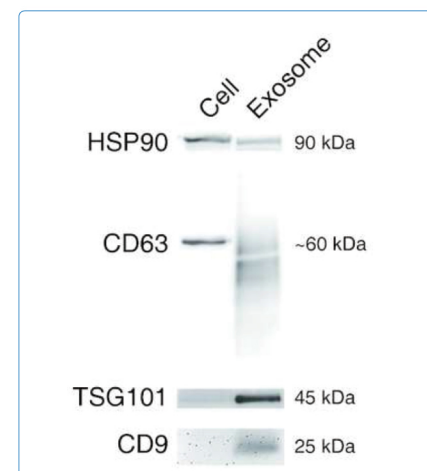


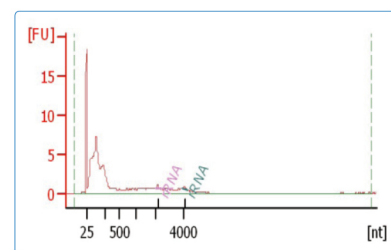
图 5 WB 实验检测外泌体标志物

参考文献:

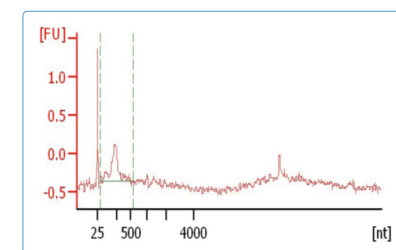
Guo J, Cui Y, Yan Z, et al. Phosphoproteome Characterization of Human Colorectal Cancer SW620 Cell-Derived Exosomes and New Phosphosite Discovery for C-HPP [J]. Journal of Proteome Research, 2016, 15(11): 4060-4072.

[5] Agilent 2100 检测外泌体 RNA 特性

外泌体中 RNA 主要集中在 200 nt 以下的小RNA 区域，> 200 nt 仅有少量的 RNA 存在。而血清/血浆中 RNA 大小分布范围比较广，既有小 RNA 存在，也有较多长 RNA 的存在。因此，如样品中 RNA 长度分布符合以上特征，可以判断外泌体质量较好。



外泌体 RNA 长度分布图



血清/血浆 RNA 长度分布图

7. 吉康特色

- 项目经验丰富：3,000 例样品实操经验积累，不断优化流程
- 全流程服务：提供从外泌体分离、微量抽提、文库构建、测序到生物信息学分析整套服务
- 全程质控：提供外泌体透射电镜检测、BCA 蛋白定量、Agilent 2100 RNA 质检及测序文库定性定量质检，有效规避实验风险，保证项目成功率

8. 外泌体送样须知

注意事项：

- 分离外泌体前的样品不能加入任何 RNA 保护剂（如 Trizol）。
- 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。
- 由于外泌体分离及电镜鉴定等前期工作量大，实验成本高，如果后续建库测序失败，客户仍需缴纳前期外泌体分离及电镜鉴定实验的费用。
- 分离外泌体的试剂盒较多，目前推荐使用 Qiagen 的外泌体分离试剂盒（exoEasy Maxi Kit）。
- 准备分选外泌体的血液样本的预处理十分重要，必须保证所有细胞碎片及其它不需要的膜结构能够有效去除。因此要求全血不可冻融，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。

8.1. 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。

注意事项：

- 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
- 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
- 离心管在放入冰箱前，用封口膜密封
- 冻存在冰箱的血清样本，避免反复冻融

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）。

8.2. 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）。

8.3. 细胞上清

注意：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）。

- (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（重要！），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：细胞培养液上清送样量最好 50 ml 以上（建议具备相应实验条件的老师，在送样前对细胞上清进行超滤，将体积浓缩到 10 ml 左右以提高外泌体的浓度，降低后续实验风险）。

9. 常见问题

[1] 哪些样品类型适合开展外泌体 small RNA 测序？

答：外泌体主要存在于体液中，根据体液类型不同，其外泌体含量有较大差别，一般在血清/血浆中含量相对较高，而细胞培养上清、尿液、唾液等中外泌体含量偏低，因此建议优先选择血清/血浆样品进行相应实验（细胞培养上清需要提供 50 ml 以上）。

[2] 外泌体的分离采用哪一种技术更好？

答：由于样本性质和来源不一，目前仍没有一种方法能兼顾外泌体得率、纯度及生物活性。目前外泌体分离技术大致分为两类：超速离心和提取试剂盒。

超速离心：是囊泡分离的“金标准”，外泌体得率较高；但对实验仪器要求特殊，耗时较长，无法实现高通量。

提取试剂盒：基于外泌体表达的特异性表面抗原，利用相应的抗体通过免疫亲和分离，无须超速离心，耗时较短，可实现高通量；但相比超速离心，外泌体得率较低。

目前吉康生物分离外泌体采用的是 Qiagen ExoEasy kit。

[3] 能否进行外泌体中 mRNA 或 lncRNA 的检测？

答：除 small RNA 外，也可以对外泌体中其他 RNA 进行检测。但外泌体中的 mRNA、lncRNA 等大分子量 RNA，含量较低、数量较少，并且稳定性比 small RNA 差，容易发生降解，检测的稳定性与重复性不如 small RNA。

愿景

探索生命奥秘、造福人类健康与生活

使命

立足生命科学、助力科学研究
推动科技创新、成就一流生物技术公司与品牌

吉康人作风

严谨务实、马上行动、行之必果

价值观

基本价值观：尊重科学、严谨求实
核心价值观：相互尊重、彼此信任、开放进取
理想价值观：主动担当、团队至上、利益他人

吉康客户观

承诺、责任、客户满意