

外泌体样本收集指南

上海宇玫博生物科技有限公司

2023 年 5 月

一、 样本制备原则

1. 代表性和一致性原则

取样的代表性和一致性关系到实验结果是否具有科学意义，应根据实验目的慎重选择取样方案。应做到实验组与对照组的样本在取材时间、部位、处理条件等方面尽可能保持一致，保证实验结果的可信度。

2. 准确性原则

准确记录代表性样本的各种特征数据，按要求（低温、迅速）采集、制备、贮存、运输，最终正确地按实验设计进行实验和数据处理。

3. 迅速性原则

样本质量影响实验结果的最关键因素，在采集、制备、贮存、运输过程中应尽可能地做到迅速，最大限度的缩短从样本采集到实验的时间。

4. 低温原则

所取样本离体后，应尽快置于干冰或-80℃冰箱中，并保证在实验前始终处于-70℃以下，以避免外泌体降解。

二、 样本制备指南

1. 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，加入适量的 PBS 缓冲液冲洗一次，彻底去除血清；对于悬浮细胞，300 g，4℃，10 min 收集细胞，然后换为新的不含外泌体的培养基或者无血清替代培养

基继续培养 24-48 小时，根据细胞的生长速度确定收取上清时间；

- 3) 收集细胞上清，300 g，4°C，离心10 min，小心收集上清，注意避免吸入细胞或者细胞碎片；
- 4) 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；
- 5) 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，装入无菌容器，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，保存会对产量有一定的影响。

注意事项：

- 1) 细胞生长正常。换无血清替代培养基（或无外泌体血清培养基）时的细胞密度与收培养上清时的细胞密度，一定要有显著增长，例如从60~70%长到90~95%。如细胞无显著增殖生长则无需收样检测，基本没有多少外泌体分泌。也应避免细胞长得过满导致细胞凋亡，细胞凋亡可能降解外泌体；
- 2) 及时离心处理。收集细胞上清后第一时间离心去除细胞及细胞碎片，离心后的细胞上清再放入-80°C冰箱保存，避免外泌体因细胞及细胞碎片存在而导致外泌体降解；
- 3) 无血清替代培养基并非指的是DMEM、1640 此类基础培养基，而是可以正常维持细胞生长的无血清替代培养基。

2. 血液

外泌体血液样本提取时，血清和血浆都可以正常提取。如果提供全血，是无法完成的，必须提前做好血清或者血浆的分离。以下是全血、血浆、血清的区别：

- 1) 全血：通过采血管采集后，经过抗凝处理的全部血液。
- 2) 血浆：经过抗凝处理的全血，进行低速离心后的上清液，为淡黄色液体。
- 3) 血清：不经过抗凝处理的血液，让它自行凝固，再进行低速离心后的上清液，为淡黄色液体。

全血经过长时间放置，或通过冷冻、或高速离心后，会发生溶血，此时无法提取外泌体。所以，一定要提前做好血清或者血浆的分离，并且采血后尽快进行分离，期间不能经过冷冻，离心时转速不可太高，离心后取上清即可，发生溶血的样本应丢弃。因血液在凝血过程中血小板受到刺激会产生大量外泌体，因此若需要排除血小板外泌体的影响应采用血浆进行外泌体提取检测。

具体血液样本操作如下：

- 1) 采血时间一般为早晨或上午；
 - a、血浆：将抗凝管收集的全血2mL，轻柔上下颠倒混匀；
 - b、血清：收集不加抗凝剂的全血2mL，加入到离心管或促凝管中，凝血后进行下一步离心；
- 2) 在1小时（室温条件下）或2小时（4°C条件下）内进行下面的操作：4°C，1900 g离心10分钟；
- 3) 吸取约1mL上清转至洁净的1.5 mL 离心管中，16000 g，4°C，离心10分钟，小心吸取上清到新的离心管中；
- 4) 放入-80°C冰箱中保存；
- 5) 填写样本登记单，记录样本名称、类型、编号、取样日期、样本处理过程等情况。

3. 尿液

- 1) 采集中段晨尿，应该尽量选择受试者的“新鲜”尿液20-100 mL，并注意避免细菌污染，收集前注意对饮食的控制，于4°C临时保存（不得超过8 h）；
- 2) 300 g，4°C，离心10 min，去除细胞等杂质；
- 3) 3000 g，4°C，离心15 min，去除细胞碎片等杂质；
- 4) -80°C冰箱中保存；
- 5) 填写样本登记单，记录样本名称、类型、编号、取样日期、样本处理过程等情况。

4. 唾液

- 1) 唾液的成分会因取样的位置和时间不同而不同，在收集的时候需固定位置或是收集所有的唾液以及定时取，至少5 mL。一般建议采样1h之内不得进食和刷牙；
- 2) 300 g, 4°C, 离心10 min, 去除细胞等杂质；
- 3) 3000 g, 4°C, 离心15 min, 去除细胞碎片等杂质；
- 4) -80°C冰箱中保存；
- 5) 填写样本登记单，记录样本名称、类型、编号、取样日期、样本处理过程等情况。

5. 乳液

- 1) 新鲜采集乳液，前2 mL左右乳液应弃去，收集至少5 mL，于4°C临时保存（不得超过8 h）；
- 2) 300 g, 4°C, 离心10 min, 去除细胞等杂质；
- 3) 3000 g, 4°C, 离心15 min, 去除细胞碎片等杂质；
- 4) -80°C冰箱中保存；
- 5) 填写样本登记单，记录样本名称、类型、编号、取样日期、样本处理过程等情况。

6. 组织块

- 1) 切取新鲜的组织块0.5-1 g左右，若为临床样本则按实际大小收集，装入样本冻存管中，若体积较大，需用手术刀或手术剪分割后保存；
- 2) -80°C冰箱中保存；
- 3) 填写样本登记单，记录样本名称、类型、编号、取样日期、样本处理过程等情况。

7. 脑脊液

- 1) 收集脑脊液10 mL，样本一经分离，请务必立即置于冰上或4°C短暂保存（不得超过4 h），避免受到血液污染；
- 2) 300 g, 4°C, 离心10 min, 去除细胞等杂质；

- 3) 3000 g, 4°C, 离心15 min, 去除细胞碎片等杂质;
- 4) -80°C冰箱中保存;
- 5) 填写样本登记单, 记录样本名称、类型、编号、取样日期、样本处理过程等情况。

8. 胸水/腹水

- 1) 收集胸水/腹水后于4°C临时保存 (不得超过8 h) ;
- 2) 300 g, 4°C, 离心10 min, 去除细胞等杂质;
- 3) 3000 g, 4°C, 离心15 min, 去除细胞碎片等杂质;
- 4) -80°C冰箱中保存;
- 5) 填写样本登记单, 记录样本名称、类型、编号、取样日期、样本处理过程等情况。

9. 外泌体

- 1) 收集细胞上清或其他体液抽提外泌体后, 用100 μ L-500 μ L PBS重悬沉淀;
- 2) 放入-80°C冰箱中保存。
- 3) 填写样本登记单, 记录样本名称、类型、编号、取样日期、样本处理过程等情况。

三、 样本包装及存储

1. 在样本保存管管壁和管盖上, 用油性记号笔标明样本编号及名称等信息, 避免被乙醇等有机溶剂抹掉;
2. 如使用离心管, 需用封口膜封口之后再冻存, 避免样本漏出;
3. 尽量避免使用标签纸或应确保粘贴牢固, 避免脱落造成样本混乱;
4. 样本采集后, 应迅速放入高质量冻存管中, 拧紧后立即放入-80°C中保存;
5. 样本应尽快进行提取检测, 储存条件以及储存时间会影响外泌体得率, 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；

6. 请在填写《样本登记单》时应当详细描述样本的类型、处理方法、储存条件以及储存时间等相关细节，以便技术人员制定合理的实验方案。

四、 样本运输

1. 干冰运输

- 1) 干冰运输应采用壁厚且质量完好的泡沫箱，样本用样本袋或样本盒包装后埋入干冰中，泡沫箱应扣严并用封箱带封严，纸壳箱包装，以免碰裂。并标明轻取轻放提示，以保证安全运输；
- 2) 干冰运输可委托当地快递公司，注意一定要确保48小时送达；
- 3) 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）。超过48小时到达的，建议不要用此法运输；
- 4) 运输时可在干冰上加放冰袋。

2. 冰袋运输

如能确保样本在24 小时内到达本公司的，以下几种类型样本可使用冰袋运输：

- 1) 保存于TRIzol或WB裂解液或PBS中的外泌体样本；
- 2) 用于抽提外泌体的新鲜的尿液、组织液样本。

五、 注意事项

1. 所有样本均应标明准确的样本编号，同时配有一张样本登记表，写明样本名称、物种、编号、取样日期、样本处理情况等。
2. 提取外泌体的得率：

- 1) 处于不同发育阶段以及不同生长条件的样本中所含有的外泌体的量不同，在某些实验条件下或某些病变部位获得的样本中外泌体的量可能与常规相应样本有显著的差异；
- 2) 储存条件以及储存时间影响外泌体得率，一般来说从新鲜的样本中总是能够得到预期的外泌体产量，未保存在-80℃或-20℃冰箱中的非新鲜样本不可靠。保存在-80℃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。因此，实验中样本需要量应以提取结果为准。

3. 关于备份

- 1) 为确保实验的顺利，建议取样时备份；
- 2) 备份分为两种：一种为严格备份，即样本取下后一分为二，这样的两份样本基本上具备同质性；另一种为非严格备份，即生物学重复的样本，这样的备份样本同质性要较前者差。

六、 样本量参照表

样本类型	所需样本参考量 (体积)	
	表征检测 (电镜、粒径、Marker 蛋白检测)	组学研究 (NGS 测序/蛋白质组)
细胞上清*	20 mL	50-60 mL
血清	1 mL	2 mL
血浆	1 mL	2 mL
尿液	20 mL	50-60 mL
唾液	5 mL	10-20 mL
乳液	5 mL	10-20 mL

组织块	0.2 g	0.3-0.5 g
脑脊液	10 mL	20-30 mL
胸水/腹水	10 mL	20-30 mL
精液	1 mL	2-4 mL
*细胞上清:	指常见的肿瘤细胞, 如 HeLa、A549、HepG2 等; 神经细胞、干细胞等分泌的外泌体量是肿瘤细胞的 1/5~1/10 左右, 因此所需培养基上清量是肿瘤细胞的 5-10 倍。	

七、 技术支持

更多技术资料您可关注宇玫博生物微信公众号获取, 或访问宇玫博生物官网: www.umibio.cn 获取, 或致电咨询:

技术热线: 021-60521508



微信扫描二维码

关注宇玫博官方微信公众号