

外泌体的提取鉴定及保存方法研究进展

张婷婷 徐婉淇 施纤红 李元 别蓓蓓
 西安培华学院医学院, 中国·陕西 西安 710100

【摘要】外泌体是一种纳米级细胞外囊泡,可携带核酸、蛋白质、脂质和其他生物活性物质,在人体的生理和病理过程中发挥作用。然而其低产量、低纯度和存储稳定性低限制了其临床应用。因此,为优化上述问题,并促进外泌体的功能研究。本文通过对大量文献的检索,对外泌体的提取、鉴定和保存方法进行了总结和探讨。

【关键词】外泌体;提取;鉴定;保存

引言

外泌体为细胞通过细胞膜内陷,形成内体,由内体产生多囊泡体,多囊泡体外膜与细胞质膜融合后,被分泌到胞外形成直径约30-100nm的外泌体^[1]。外泌体表层和内部均含有多种组成成分,包括转录因子、受体、酶、蛋白质和核酸(DNA、mRNA、miRNA和lncRNA)等,多种功能组分可参与细胞交流、细胞游移、血管更新和肿瘤细胞生长与抑制等复杂过程^[2]。因此阐明外泌体的调节机制及外泌体的分离、提纯、鉴定等方法的创新,在临床微创诊断和疾病治疗等方面极具研发前景。本研究针对近年来国内外关于外泌体提取、鉴定和保存方法等方面的研究进展加以综述,推动相关技术的研发和转化,为疾病诊断和治疗提供技术支持。

1 外泌体的分离提纯

基于不同的分离原理,目前建立了7种主要的提取纯化技术,这里将目前常用的外泌体的分离提纯方法及其优缺点进行了总结比较,具体见表1。

1.1 超速离心法

应用超速离心原理的方法主要分为两类,一是差速离心法,二是密度梯度离心法。差速离心法是目前外泌体分离和浓缩最常用的一种方法,先后以300g、2000g和10000g离心,再利用超高速离心(>100000g)获得外泌体的粗提取产物,重复操作2次,从而获得较为纯净的外泌体。此方法适合大剂量样品的分离处理,但设备价格昂贵,操作复杂,且在分离过程中,由于超高速离心,外泌体的结构、生理功能易遭到破坏,聚集成块,夹杂杂质。

密度梯度离心法的介质主要是碘克沙醇和蔗糖。以蔗糖为例,制取不同浓度梯度的蔗糖溶液,依次加入待分离溶液。在超速离心作用下,溶液由低到高形成连续分布的密度梯度层,实验结果表明外泌体将在1.13-1.19g/mL的密度系数区域内富集。此方法分离的外泌体纯度较高,但不适合大规模提取。

1.2 超滤法

超滤法最常用的过滤膜孔径为0.2nm、0.45nm或0.8nm。基于超滤法原理改进的旋转超滤法则利用氮气产生的高压使细胞上清液经100000NWCO超滤膜的过滤,再通过磷酸盐缓冲液(PBS)的多次冲洗以最大限度降低培养液中蛋白质的污染程度,最终获得外泌体。此法缩短了分离时间且不需再添加化学试剂,故对外泌体成分基本无破坏,但提取纯度和产量较低。

1.3 尺寸排除色谱法

尺寸排除色谱法确定好固定相孔径的大小,样品以重力低落的方式收集,半径大于固定相孔径的颗粒则无法进入孔中,从而实现不同粒径大小颗粒的分离。尺寸排除色谱法中所用的凝胶材料聚合物多为交联葡聚糖、琼脂糖或烯丙基葡聚糖等。此方法分离血浆中外泌体可达到较高的纯度,不影响外泌体结构和完整性,但是与外泌体同样大小的污染物无法筛除。

1.4 聚合物沉淀法

聚合物沉淀法常用的聚合物为聚乙二醇(PEG)。实验步骤是

取0.1kg/L的PEG进行2次沉淀实验,以更好地消除血清蛋白质的干扰。通过聚合物沉淀法所获得的外泌体纯度较高,不需要大型仪器设备,可处理大剂量样品,但会受到其他共同沉淀的物质的污染。

1.5 商品化试剂盒法

商品化试剂盒沉淀法具备使用简单、不需要昂贵设备等优势。但市面上的商品化试剂盒往往售价比较昂贵,不利于大规模地提取外泌体。各个品牌试剂盒外泌体质量良莠不齐,其标志物特异性表达情况存在较大差别,与其他方式提取的外泌体也有很大差异。

1.6 免疫亲和捕获

免疫亲和捕获法分离外泌体主要是通过平面或磁珠上嵌入含标记物的抗体,依靠外泌体表面的特异性标志抗原(如CD9、CD63、CD81等)进行捕获。免疫亲和捕获是分离具有特定来源的明确外泌体亚群的理想平台,区分度高,操作简便且不影响外

表1 外泌体分离方法比较

方法名称	优势	劣势
差速离心法	金标准、纯化率高、可大量提取、可使用的样品种类多	操作复杂,高度依赖人工;破坏外泌体结构,形态;离心管壁吸附,造成损耗;设备昂贵;分离外泌体聚集成块,回收率低
密度梯度离心法	纯度高,生物结构性能更好	样品预处理繁琐,设备昂贵,技术要求高,高渗试剂易造成细胞失水
超滤法	操作简单快捷,回收率高,设备成本低,无化学试剂污染	通过膜的时候外泌体易损耗变形,生物活性低,堵塞可能性大,可溶性蛋白污染严重,易附在膜上而损失,同样大小的物质也会被过滤出来,纯度较低,可持续
尺寸排除色谱	高纯度,高灵敏度,外泌体完整性和生物活性较好,无化学试剂污染,防止外泌体聚集	耗时长,产量低,需专用仪器,得率低,成本高,对进样量有严格限制
聚合物沉淀法	操作简单,时间较短,不需要特殊仪器设备,回收率高,完整性好	杂质较多,特异性低,化学试剂污染,分离出的外泌体大小不均
商品化试剂盒	使用方便,不要求专业设备,可扩大样品容量	杂蛋白污染多,外泌体质量参差不齐,形态差,试剂昂贵
免疫亲和捕获	特异性高,可获得高纯化的外泌体,操作简单,时间较短,可回收抗体	外泌体表面特异标记未完全明确,试剂成本高,回收效果依赖于抗体性能,回收率低
微流体技术	自动化,低成本,易集成,液体的流动可控,试剂耗费较低,回收率高,提取分析可结合进行	外泌体表面特异标记未完全明确,试剂成本高,回收效果依赖于抗体性能,回收率低

泌体形态的完整性。但不能保证每一批次的抗体活性相同,不可控因素较多。

1.7 微流体技术

微流控技术分析速度快、通量高、试剂消耗少,可满足大量临床样本中的快速检测需求。尽管微流控技术在外泌体分离、分析领域已经取得了显著进展,但是通常需要和一些仪器如注射泵、荧光检测仪等进行联用,这在一定程度上限制了其推广应用。

综上,由于外泌体尺寸较小且密度与体液相近,目前没有任何单一方法能够达到高纯度大量提取的要求。在2013年,Gardiner提出了结合超滤和的外泌体分离策略,有效提高了外泌体的纯度和提取量。故当前可选取组合不同分离提纯方法尽可能满足实验所需,但要在临床推广使用仍有一定难度。(表1)

2 外泌体的鉴定

2.1 电镜观察法

电镜观察法常用的有扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)、透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)等。具体操作方法如下:将PBS试液重悬提取的外泌体,滴于孔径2nm的载样铜网上,室温下静置3min,用滤纸从滤网侧边吸干液体,再用3%磷钨酸水溶液在室温下负染5min,滤纸吸干负染液,室温下晾干,用电镜进行观察拍照。高分辨率的电子显微镜成像是观察外泌体的大小、形态等最常用的选择,但不便于大量快速检测。

2.2 纳米颗粒跟踪分析法

纳米颗粒跟踪分析法(nanoparticle tracking analysis, NTA)被用来检测外泌体粒径及浓度。具体方法是:将收集的外泌体用PBS稀释至106/mL,再用1mL注射器注入仪器;激光光束穿过外泌体,使用带有摄像头的显微镜观察颗粒,捕捉外泌体的布朗运动,用爱因斯坦方程组式测算物质含量和流体力学直径。此方法具有较高的精确度,样品处理简单,耗时短,能保证外泌体原始状态,但设备昂贵。

2.3 蛋白质免疫印迹和酶联免疫吸附法

蛋白质免疫印迹法(Western Blot, WB)和酶联免疫吸附法(ELISA)可用于外泌体表面标志蛋白鉴定和定量。利用外泌体表面特异抗原递呈的蛋白质有CD63、CD8、TSG101、Flotillin-1、ALIX、CD9、CD81和CD82等。WB是目前比较成熟的经典鉴定方法,特异性高,但操作繁琐,耗时长。ELISA的优势是有很强特异性和精准性,时间短,通量高,但抗原需要两个或两个以上的抗原表位。

2.4 流式细胞仪检测法

流式细胞仪检测技术通过特殊的荧光信号及非荧光散射信号,测定外泌体的大小、表面标志物和数量分布等,也可通过荧光标

记示踪外泌体。研究者开发出纳米流式细胞仪,还新构建了一种基于pH响应的外泌体可控组装系统,该系统可以将单个纳米尺寸的外泌体转化为微米尺寸的外泌体团簇,突破了常规流式细胞仪无法直接用于外泌体分析的尺寸限制。流式细胞仪检测法比较快速、灵敏,适合高通量筛选,所需样本量较小,但设备使用要求较高。(表2)

3 外泌体的保存

外泌体提取后一般悬浮于磷酸盐缓冲液中,优良的保存方法是外泌体广泛应用的重要前提,以下介绍外泌体的主要保存方式:

3.1 冷冻保存

冷冻保存是目前最常用的储存方法,将温度降低到外泌体生化反应所需的温度以下,通常为4°C、-80°C(最常用)和-196°C。但是,这种保存方法容易破坏外泌体,因此添加一种或多个浓度适当的防冻剂,如可穿透细胞的防冻剂二甲基硫化和乙二醇;不可渗透的防冻剂三氯蔗糖、蔗糖和其他碳水化合物,从而延长外泌体保质期。

3.2 冻干保存

冻干保存是使用冷冻干燥机将外泌体溶液迅速冻结,在真空无菌的条件下将冻结的水分升华,从而分离干燥外泌体^[3]。研究证实外泌体经冻干、再活化处理后仍保持膜完整性,且外泌体蛋白测得含量恒定,不存在机体排异反应,注射安全可靠,但外泌体直径变大,外泄的蛋白增多,外泌体存在破裂,生物活性下降。

3.3 喷雾干燥保存

喷雾干燥法是将外泌体溶液在干燥室雾化后,其中水分在与高温气体充分接触时快速蒸发,获得干燥粉末。在这个过程中,雾化压力和出口温度是主要影响外泌体稳定性的因素。喷雾干燥可降低成本,连续生产,但同样会降低外泌体生物活性。

3.4 水凝胶保存

水凝胶具有网状交联结构可将外泌体温和地嵌入其中,最大程度维持外泌体活性。水凝胶材料主要有天然来源材料,合成材料及组合材料。天然来源材料主要有蛋白类:胶原蛋白、纤维蛋白和角蛋白等;多糖类:海藻酸钠,琼脂糖等。合成材料有:聚己内酯、聚乙二醇、和聚乙醇等^[4]。组合材料则是将天然来源材料与合成材料合用。水凝胶保存法提高了外泌体在体内的驻留率和驻留时间,增加了其应用治疗的有效性,同样存在外泌体生物活性下降的情况。

4 展望

外泌体其广泛的应用前景充满了潜力和挑战,其蛋白质、脂质成分、代谢机制、转录方式等方面仍有许多问题尚未阐明,需要研究者从其分离提纯、保存运输、科研开发、临床治疗等全方面多角度进行深入研究,制定高效、统一的外泌体质量标准,共同推进发展。

参考文献:

- [1]Kalluri R, LeBleu VS(2020)The biology function and biomedical applications of exosomes. Science. ,367,6478.
- [2]He C, Zheng S, Luo Y, Wang B.(2018)Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. Theranostics.8(1):237-255.
- [3]李洪超,金银鹏,王哲,李莉,傅青春.人脂肪干细胞及外泌体冻干粉的安全性[J].中国组织工程研究,2018,22(29):4593-4600.
- [4]韩超珊.MiR-675和水凝胶对间充质干细胞外泌体的改造和应用研究[D].苏州大学,2019.

表2 外泌体鉴定方法的比较

方法名称	优势	劣势
电镜观察法	可观察外泌体结构和形态;扫描电镜可得表面形态,透射电镜可观察到内部结构	样品预处理复杂,要求较高,不利于大量快速检测,无法测定预处理后外泌体浓度,所需设备昂贵,外泌体结构破坏
纳米颗粒跟踪分析法	可直接,实时观测外泌体	不适合形态大小不一的复杂外泌体样本的鉴定
蛋白免疫印迹法	方法成熟,特异性高	不同来源外泌体检测标志物不同,操作复杂
酶联免疫吸附法	有很强特异性和精准性,时间短,通量高,	抗原需要两个或两个以上的抗原表位
流式细胞仪检测法	快速,高通量,可分析外泌体的大小,所需样本含量少	不能分辨较小的外泌体,精准度和分辨率欠佳,设备使用要求较高