

干货！脑浆组织如何提取外泌体

外泌体是由细胞内多泡体与细胞膜融合后，释放到细胞外的一种直径约 30~150 nm 的膜性囊泡。几乎所有的细胞都会产生外泌体，被分泌出的外泌体会进入各种体液，通过循环系统到达其他细胞与组织，产生远程调控作用。

越来越多的研究表明神经系统中的生理功能和病理功能与外泌体密切相关，例如：参与神经发育和神经元活动，参与神经退行性疾病调控等。

本文中整理了一种可以从脑浆组织中分离和提取外泌体的操作步骤，供大家参考！

相关试剂：

- 1, Hibernate E Solution (BrainBits, Springfield)
- 2, 木瓜蛋白酶 papain (Worthington)
- 3, Umibio Exosome Isolation Kit
- 4, PBS

相关设备：

- 1, 匀浆器
- 2, 网状过滤器 40- μm
- 3, 注射器过滤器 0.2 μm
- 4, 高速离心机
- 5, 涡旋振荡器

操作步骤：

一) 脑浆液化处理：

- 1, 将新鲜或先前冷冻的小鼠半脑切开，加入 Hibernate E 溶液 (3 mL /半脑)；
- 2, 加入 20 单位/mL 的木瓜蛋白酶，在 37°C 水浴 15 分钟；
- 3, 加入等体积预冷 Hibernate E 后，轻轻匀浆；匀浆过程中在冰上进行；
- 4, 脑匀浆通过 40- μm 网状过滤器过滤；
- 5, 滤液再通过 0.2- μm 过滤器过滤，收集滤液；

二) 液化脑浆预处理：

- 1, 离心去碎片：将液化脑浆液转移至离心管中，于 4°C 以 3000 g 离心 10 min，去除滤液中的碎片；离心后上清液转移到新的离心管中；
- 2, 离心去杂质：转移后的上清液于 4°C 以 10000 g 离心 20 min，去除样品中杂质，将离心后的上清液转移至新的离心管中；

三) 脑浆外泌体的提取：

通过 Umibio Exosome Isolation Kit 提取外泌体颗粒。

- 1, 上清液预处理：在去除杂质的离心上清液中加入 Exosome Concentration Solution (ECS 试剂)，具体的加入剂量如下：

样品名称	样品剂量	加入 PBS 溶液	加入 ECS 剂量
液化脑浆液	1mL	4mL	1 mL

注：其他剂量规格请根据表中的试剂用量等比例换算

2, 溶液混合：加入 ECS 试剂后将离心管盖紧，通过涡旋振荡器混匀 1 min，再放置于 2℃ 至 8℃ 静置 2 h；

3, 沉淀外泌体：取出装有混合液的离心管于 4℃ 以 10000 g 离心 60 min，弃上清，沉淀中富含外泌体颗粒；（注：尽可能吸净上清液）

4, 外泌体重悬：取 100 μ L 1×PBS 均匀吹打离心沉淀物，待其均匀悬浮在 PBS 中后，将重悬液转移至新的 1.5 mL 离心管中；

5, 收获外泌体颗粒：将含有重悬液的 1.5 mL 离心管于 4℃ 以 12000 g 离心 2 min，保留上清液，该上清液中富含外泌体颗粒。（注：若离心沉淀物肉眼可见，再离心一次）

6, 纯化外泌体：将收获的外泌体颗粒粗品转入 Exosome Purification Filter (EPF 柱) 上室中，于 4℃ 以 3000 g 离心 10 min，离心后收集 EPF 柱管底的液体，此液体即为纯化后的外泌体颗粒；

7, 外泌体的保存：纯化后的外泌体以保存于 -80℃ 低温冰箱中，以备后继实验使用。

参考文献：

- 1, J Biol Chem. 2012 Dec 14;287(51):43108-15.
- 2, J Extracell Vesicles. 2017 Jul 26;6(1):1348885.