

1.4.6.2 外泌体

外泌体(exosom)是细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)中的重要组成部分,由于它们含有丰富的生物标志物,在细胞的社交网络里充当重要角色,作为生物学研究中的一个新兴领域越来越受到关注。根据国际细胞外囊泡协会2014年发表的一个指导手册(MISEV),用透射电镜来观察样品中细胞外囊泡的形态特征是鉴定EV的基本方法之一。外泌体的30~150 nm杯状膜性微囊结构,可采用透射电镜负染色技术观察记录。

(1) 实验样品的准备

实验样品为脐静脉内皮细胞源的外泌体小泡。提取方法如下。

① 梯度离心 细胞培养基先后300 g (10min)、2 000 g (10 min)、18 000 g (30 min), 4℃低温离心,离心后收取上清液,0.22 μm滤器过滤,以去除培养基中的死细胞、细胞碎片、微泡及凋亡小体。

② 超滤 将上述培养基用 1×10^5 超滤管浓缩为2 mL左右。

③ 蔗糖重水垫 将0.6 mL的300 g/L蔗糖重水溶液(密度

1.210 g/cm³)加到超离管中,将含有外泌体的液体小心加到蔗糖重水垫的上方,以PBS缓冲液补足体积。使用超速离心机以110 000 g速度4℃低温离心70 min。

④ 吸弃上层PBS,收集含有外泌体的蔗糖重水层,以10 mL左右冷PBS稀释后加到 1×10^5 超滤管中浓缩为0.2 mL左右。将上述0.2 mL超滤液加到超离管中,以PBS补足体积,超速离心机110 000 g低温离心70 min,管底可见黄白色沉淀物。

⑤ 弃上清,将沉淀物以4 mL冷PBS重悬,110 000 g低温离心70 min,弃上清,所得沉淀物即为纯化后的外泌体。采用BCA试剂盒定量。-80℃冰箱保存。注意所有离心都必须在4℃低温进行。

(2) 实验试剂与材料的准备

① 新鲜配制的PBS缓冲液(pH 7.4)。

② 2.5%戊二醛固定液(pH 7.0~7.4)。

③ 40 g/L乙酸双氧铀染液(pH 7.0~7.4)。

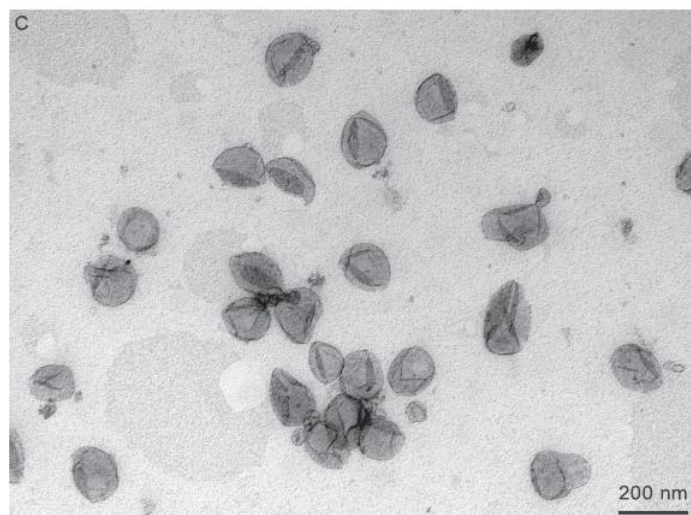
④ 新鲜配制的10 g/L甲基纤维素溶液(25 cps)。

⑤ 带有覆碳Formvar支持膜的洁净载网。

(3) 外泌体负染色实验步骤

① 备好的封口膜洁净面朝上放,将新鲜外泌体外泌体溶液滴在上面。

② 将载网的膜面放在外泌体液滴上,悬浮10 min,用滤



纸缓慢吸干。

③ 转移载网到2.5%戊二醛液滴上,悬浮5 min,用滤纸吸干。

④ 将载网转移到去离子水液滴上,每次2 min,10次,每次均用滤纸吸干。

⑤ 转移载网到40 g/L乙酸双氧铀液滴上,10 min,用滤纸吸干。

⑥ 转移载网到10 g/L甲基纤维素液滴上,5 min,用滤纸吸干。

⑦ 自然晾干(≥ 30 min)后透射电镜观察记录(图1-70)。

(4) 外泌体负染色实验注意事项

外泌体负染色看起来很简单,但要获得清晰的膜结构尚需斟酌具体操作细节。上述实验方法基本参考了Théry (2006)的方法,容易获得较高成功率。

实验注意事项:① 所有操作均在低温下进行,封口膜铺在培养皿上,培养皿放在冰块上,保持低温环境;② 在所有操作步骤中,让液体仅吸附于载网的有膜面,使无膜面保持载网干燥;每一次换液,均更换洁净封口膜;③ 控制甲基纤维素薄膜的厚度对获得最佳对比度和精细结构至关重要,甲基纤维素使用前充分溶解,4℃保存;④ 在配制和使用乙酸双氧铀操作中,注意防护和避光。