

技术与方法

多发性骨髓瘤患者血清外泌体提取方法优化与应用

魏晓晶 杜辰星 许杰 于珍 刘兰婷 邱录贵 郝牧*

(中国医学科学院北京协和医学院血液病医院(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

摘要 外泌体提取方法多样, 目前没有统一的标准, 每种方法都各有其优缺点, 因此该文针对多发性骨髓瘤患者血清中外泌体的两种提取方法进行比较, 总结出一种适合患者血清这种量少而珍贵标本的外泌体的提取方法。试剂盒提取方法能够获得充足的外泌体但是会引入杂质。差速超离方法获得的外泌体量较少, 损耗过多的外泌体, 难以进行后续外泌体内RNA提取等实验, 因此获取外泌体内的蛋白或核酸存在困难。该研究将差速超离提取方法以及试剂盒提取方法两者的优点结合, 总结出一种更省时、便捷, 获得更高纯度外泌体的方法。

关键词 外泌体; 多发性骨髓瘤; 差速超离; RNA提取

Optimization and Application of Serum Exosome Extraction in Patients with Multiple Myeloma

Wei Xiaojing, Du Chenxing, Xu Jie, Yu Zhen, Liu Lanting, Qiu Lugui, Hao Mu*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Hematology and Blood Diseases Hospital & Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract Exosome extraction methods are diverse, and there is no unified standard at present. Each method has its own advantages and disadvantages. Therefore, this paper compared the two methods of exosome extraction in serum of multiple myeloma patients, and summarized a method suitable for the extraction of exosome in patients with small amount and precious specimens. The kit extraction method can obtain sufficient exosomes but introduce impurities. Due to the small amount of exosomes and excessive loss of exosomes, it is difficult to carry out subsequent experiments such as the extraction of RNA in exosomes, so it is difficult to obtain proteins or nucleic acids in exosomes. In this paper, the advantages of differential ultracentrifugation extraction method and kit extraction method were combined to summarize a more time-saving and convenient method with higher exosome purity.

Keywords exosome; multiple myeloma; differential ultracentrifugation; RNA extraction

收稿日期: 2019-02-20 接受日期: 2019-05-16

中国医学科学院医学与健康科技创新工程(批准号: CAMS-2017-I2M-1-005、CAMS-2016-I2M-3-013)、国家自然科学基金(批准号: 81630007、81570181)和中国医学科学院中央公益性科研院所基本科研业务费2018年青年医学人才奖励项目(批准号: 2018RC320012)资助的课题

*通讯作者: Tel: 022-23909106, E-mail: haomu@ihcams.ac.cn

Received: February 20, 2019 Accepted: May 16, 2019

This work was supported by the Chinese Academy of Medical Sciences Medical and Health Science and Technology Innovation Project (Grant No.CAMS-2017-I2M-1-005, CAMS-2016-I2M-3-013), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81630007, 81570181), Basic Scientific Research Operating Expenses of the Central Institute of Public Welfare Scientific Research and the Chinese Academy of Medical Sciences (Grant No.2018RC320012)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23909106, E-mail: haomu@ihcams.ac.cn

网络出版时间: 2019-09-12 14:50:49 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190912.1450.026.html>

外泌体是一种大小为30~150 nm^[1-2]磷脂双分子层结构的囊泡。这种小的杯状囊泡已有30多年的研究历史, Valadi等^[3]在2007年发现外泌体中携带有核酸(mRNA、microRNA等)和蛋白质。外泌体携带的mRNA可以进入胞质中并被翻译成蛋白质, 不仅仅是mRNA, 外泌体内的microRNA同样具有生物活性, 在进入靶细胞后可以靶向调节细胞中mRNA的表达水平。目前认为, 外泌体是细胞间信息交流的重要媒介^[4], 外泌体内携带的物质可作为疾病诊断的分子标志物^[5], 外泌体同样可作为药物载体^[6]靶向疾病部位。因此, 外泌体内所携带的核酸和蛋白质就成为了大家探索研究的对象, 更多的研究者投入到对外泌体功能揭示的热潮中。但是, 由于外泌体提取方法不统一, 以及研究对象的差异, 因此, 外泌体目前没有统一的提取方法。本实验通过对多发性骨髓瘤患者血清外泌体的差速离心提取方法以及试剂盒的提取方法进行比较, 讨论这两种方法各自的优缺点, 并将两者的优点进行结合, 创新出一种即省时又高效的骨髓瘤患者血清外泌体的提取方法。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂及仪器

宫颈癌细胞株(HeLa细胞)由中国医学科学院基础研究所提供; PBS购自美国HyClone公司; CD63、TSG101、Calnexin抗体购自英国Abcam公司; 蛋白Marker(#26617)购自美国Thermo Scientific公司; PVDF膜(Cat No.IPVH00010)购自美国MILLIPORE公司; 一抗(P0023A)稀释液购自上海碧云天生物技术有限公司; 试剂XBP、试剂XWP、膜吸附柱exoEasy Midi Spin Columns、柱子RNeasy® MinElute® Spin Column来源于试剂盒QIAGEN exoRNeasy Serum/Plasma Midi Kits(cat.No.77044)购自德国Qiagen公司; 试剂XE(Lot No.160011905)购自德国Qiagen公司; 低温差速离心机购自美国Beckman公司; 超速离心管(344058)购自美国Beckman公司; 外周血来源于患者临床检验后的废弃标本; 透射电镜以及外泌体磷钨酸染色均为天津医科大学大型仪器共享平台提供; Nanosight粒径分析仪由天津市神经病学研究所提供。

1.2 差速超离提取外泌体的方法

Théry等^[7]阐述了差速超离提取外泌体的方法, 将该方法结合血清外泌体的提取方法^[8]之后如下, 全血2 500 ×g离心10 min分离血清, 将血清与PBS按

照1:1的体积比混匀; 2 000 ×g离心30 min; 12 000 ×g离心45 min去除蛋白等杂质; 0.2 μm滤器过滤, 将上清置于超离管中, 在130 000 ×g离心2 h, 弃上清, 加入PBS洗涤, 再一次130 000 ×g离心2 h, 得到的沉淀在150~200 μL中重悬, 重悬液中即含有外泌体。以上所有离心步骤均需在4 °C的条件下进行。

1.3 试剂盒提取外泌体的方法

全血在2 500 ×g离心10 min, 将上清用0.45 μm滤器过滤后16 000 ×g离心10 min, 弃沉淀留上清; 将试剂XBP与样品上清按体积比1:1混合后加入到柱子中; 500 ×g离心1 min, 弃管底液体; 3 500 ×g离心1 min去除残留在膜上的液体, 再向柱子中加3.5 mL试剂XWP, 3 500 ×g离心5 min, 弃管底液体; 400 μL试剂XE加到柱子上, 3 500 ×g离心5 min的条件下将外泌体洗脱, 得到含有外泌体的液体样本。

1.4 改良外泌体提取方法

外周血在4 °C、2 500 ×g离心10 min, 上清转移到EP管中; 2 000 ×g、4 °C离心30 min; 12 000 ×g、4 °C离心45 min, 留上清; 0.2 μm滤器过滤上清并转移到新的EP管中; 将试剂XBP与样品按照体积比1:1的比例混合后转移到膜吸附柱exoEasy Midi Spin Columns中, 500 ×g离心1 min, 弃管底液体; 3 500 ×g离心1 min去除残留在膜上的液体; 向柱子中加3.5 mL试剂XWP, 3 500 ×g离心5 min, 弃管底液体, 将柱子换到新的离心管中; 400 μL试剂XE加到柱子中3 500 ×g离心5 min将外泌体洗脱, 得到含有外泌体的液体。

1.5 RNA的提取方法

在含有外泌体的重悬液中加700 μL QIAzol, 涡旋5 s, 室温(15~25 °C)静置5 min, 加入90 μL氯仿用力上下摇晃15 s, 室温静置2~3 min, 12 000 ×g、4 °C离心15 min; 将上层水相转移到新的EP管中; 加入上层水相二倍体积无水乙醇(如, 400 μL的上层水相应加入800 μL无水乙醇), 混匀后吸取700 μL的液体加到柱子上, 8 000 ×g离心15 s, 弃管底液体; 剩余液体重复以上步骤, 直至将所有的液体转移; 700 μL缓冲液RWT加到柱子上8 000 ×g离心15 s, 弃管底液体; 500 μL buffer RPE加到柱子上, 8 000 ×g离心2 min, 弃管底液体; 将柱子转移到新的收集管中, 开盖, 14 000 ×g离心5 min; 再次将柱子转移到新的1.5 mL离心管中, 14 μL无RNA酶水加入到柱子的膜中心, 室温静置2 min, 14 000 ×g离心2 min, 收集管底

含有RNA的液体,并储存于 -80°C 冰箱中。

1.6 Western blot

20 μL RIPA与20 μL 外泌体重悬液混匀后,冰上裂解30 min,用BCA蛋白定量方法测出外泌体的蛋白浓度;5 \times SDS上样缓冲液与外泌体混匀后 95°C 5 min, 瞬离,上样体积为20 μL ; marker上样为5 μL marker+15 μL 1 \times SDS;先70 v跑出marker条带后将电压调至100 V,总时间约为120 min;裁剪8 cm \times 5 cm的PVDF膜并浸泡到甲醇中,250 mA转膜2 h,5%的脱脂牛奶(5 g脱脂奶粉+100 mL TBST)室温封闭1 h; CD63(1:500的比例稀释)、TSG101(1:1 000的比例稀释)、Calnexin(1:1 000的比例稀释)用一抗稀释液稀释,将膜在一抗稀释液中 4°C 过夜孵育;TBST室温洗3遍,每遍10 min,随后,室温孵育二抗1 h, TBST室温洗3遍,每遍10 min,即可显影。

2 结果

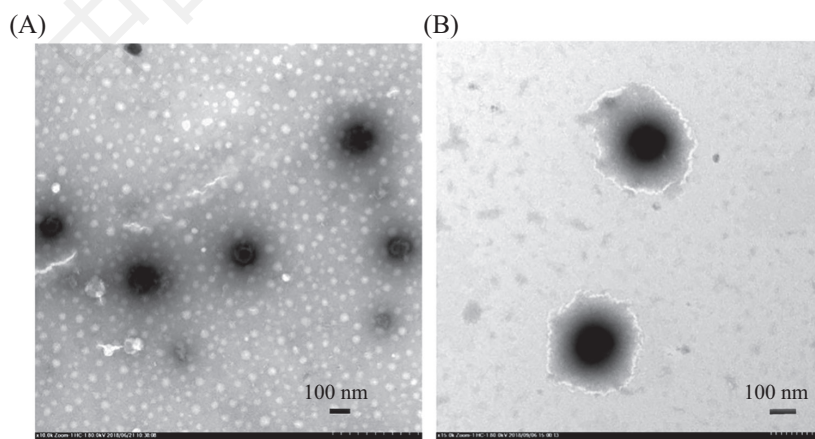
2.1 外泌体的鉴定

国际细胞外囊泡学会(ISEV)于2014年发布了研究和定义细胞外囊泡及其功能所需要的最少实验要求的指导性声明文件。文件指出:对于外泌体的鉴定必须从形态、蛋白分子标记、粒径大小等三个方面进行鉴定^[9]。使用差速超离方法提取的外泌体以及试剂盒方法提取得到的外泌体均进行了透射电镜的拍摄,但是仅试剂盒方法提取的外泌体拍到了典型的像杯子的形态(图1A),电镜下观察到囊泡的

大小在100 nm。改良外泌体提取方法也得到了外泌体的典型电镜图(如图1B所示),差速超离的方法挑选较多的视野仍不能拍摄到外泌体的典型形态。用Western blot的方法对外泌体表面蛋白CD63以及外泌体内Tsg101蛋白标志物进行检测,实验结果表明,三种提取方法均能够检测到外泌体的标志物(图2),但是试剂盒提取外泌体的方法引入了蛋白杂质-钙黏连蛋白(calnexin)。通过Nanosight对外泌体进行粒径大小的检测发现,三种提取方法得到的外泌体大小均在150 nm左右,符合外泌体的正常粒径大小(图3)。因此,由外泌体的鉴定结果可以看出改良外泌体提取方法可以将一些蛋白杂质在差速离心的过程中去除,所以此方法相较于差速超离方法以及试剂盒提取方法更为优化,能够得到更纯的外泌体。

2.2 RNA 质检结果的比较

将三种方法提取的外泌体使用相同的RNA抽取方法,得到的RNA使用Agilent2100生物分析仪进行RNA质检。在25~200 nt之间有峰即表明提取到RNA。质检结果发现差速超离方法提取的外泌体均未得到RNA,但是使用试剂盒提取的外泌体均能得到RNA的峰图(图4)且改良外泌体提取方法也能够提取得到RNA。对RNA提取结果进行比较发现,由于差速超离得到的外泌体的含量较少,则不能够得到充足的RNA,不利于后续对于外泌体内含物的分析,而使用试剂盒进行外泌体提取的方法能够得到外泌体内的RNA,便于进行外泌体内核酸

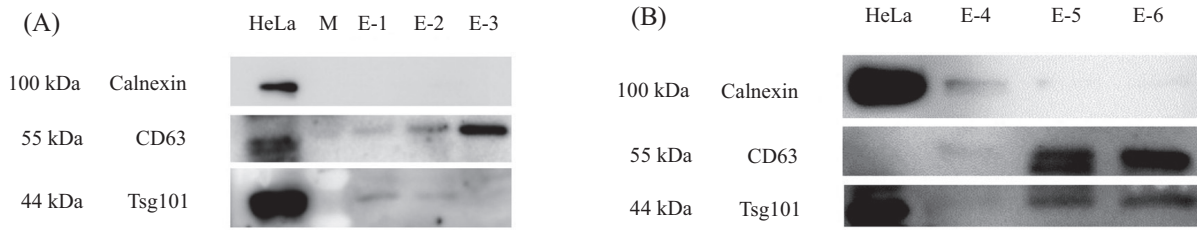


A: 试剂盒提取方法提取的外泌体的透射电镜图; B: 改良外泌体提取方法提取的外泌体的透射电镜图。

A: transmission electron micrograph of exosome extracted by kit extraction method; B: transmission electron micrograph of exosome extracted by improved exosome extraction method.

图1 外泌体的透射电镜图

Fig.1 Transmission electron micrograph of exosomes

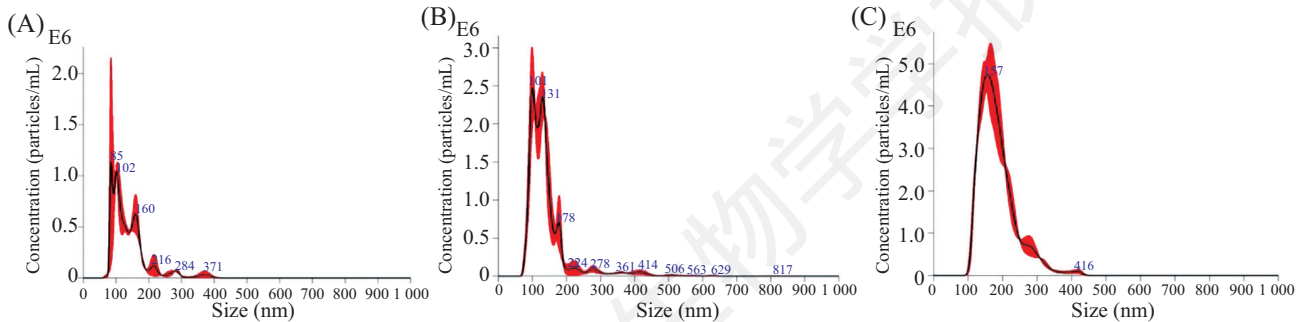


A: 差速超离方法提取的外泌体的Western blot; 其中HeLa为阳性对照, M为蛋白marker的简写, E-1、E-2、E-3为外泌体的编号; B: E-4、E-5为试剂盒方法提取的外泌体的Western blot; 其中E-4、E-5为外泌体的编号; E-6为改良外泌体提取方法提取的外泌体的Western blot; 其中E-6为外泌体的编号。

A: Western blot of exosomes extracted by differential ultracentrifugation method; HeLa is the positive control, M is the abbreviation of protein marker, and E-1, E-2 and E-3 are the numbers of exosomes; B: Western blot of exosomes extracted by kit method; Where E-4 and E-5 are the numbers of exosomes; Western blot of E-6 exosomes extracted by improved exosome extraction method; Where E-6 is the number of exosome.

图2 外泌体蛋白标志物的检测

Fig.2 Detection of exosome protein markers



A: 差速超离方法提取的外泌体的粒径分布图, 平均粒径大小为137.7 nm, 浓度为 $7.51e^7 \pm 9.84e^6$ particles/mL; B: 试剂盒提取方法提取的外泌体的粒径分布图, 平均粒径大小为143.0 nm, 浓度为 $1.75e^8 \pm 8.54e^6$ particles/mL; C: 改良外泌体提取方法提取的外泌体的粒径分布图, 平均粒径大小为156.6 nm, 浓度为 $4.89e^8 \pm 1.63e^7$ particles/mL。

A: particle size distribution of exosomes extracted by differential ultracentrifugation method, mean particle size was 137.7 nm, and particle concentration was $7.51e^7 \pm 9.84e^6$ particles/mL; B: particle size distribution diagram of exosome extracted by the kit extraction method, with average particle size of 143.0 nm and concentration of $1.75e^8 \pm 8.54e^6$ particles/mL; C: particle size distribution diagram of exosome extracted by improved exosome extraction method, with average particle size of 156.6 nm and concentration of $4.89e^8 \pm 1.63e^7$ particles/mL.

图3 外泌体的粒径检测结果

Fig.3 Particle size detection results of exosomes

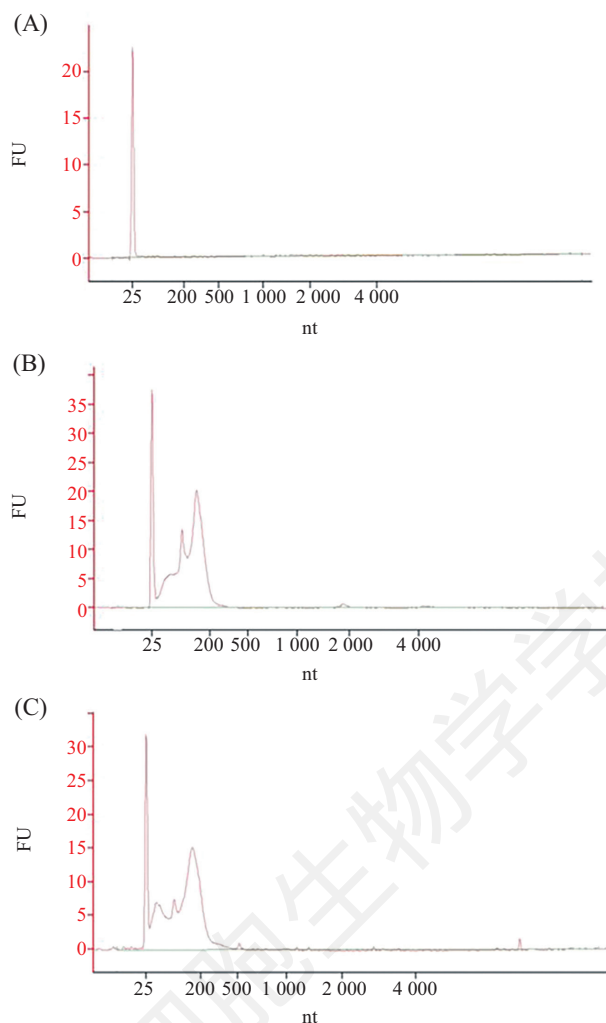
的检测, 因此对于起始体积较少的血清, 在无法改变起始体积的情况下推荐使用试剂盒的方法提取外泌体。

3 讨论

差速超离提取外泌体的方法是通过不断地提高离心速度将血清中的杂质去除, 接着使用超速离心将外泌体离心沉淀下来。本实验中差速超离提取外泌体的方法使用的起始血清体积为1 mL, 为了验证差速超离方法提取外泌体的可行性, 将起始血清体积增加到2 mL, 但是依然未能得到外泌体内RNA的质检峰图。从外泌体的鉴定结果分析, 差速超离方法提取的外泌体能够进行Western blot的外泌体表面标志物的鉴定, 证实能够得到类似外泌体的东

西, 但是可能由于得到的外泌体数量较少, 难以满足透射电镜拍摄的需求以及对外泌体内核酸提取的需求, 所以在起始体积较少的情况下使用差速超离的方法进行外泌体的提取不易得到充足的外泌体。试剂盒提取方法验证过最少起始体积为250 μ L的血清, 依然能够提取到外泌体以及外泌体内的RNA, 所以试剂盒方法适用于起始量较少的标本的外泌体提取。对于差速超离这种经典的提取外泌体的方法不适合于本实验, 猜测其原因可能是差速超离的方法本身在离心以及多次更换耗材的过程中都会增加对外泌体的损耗, 故丢失的外泌体较多, 难以得到充足的外泌体。

试剂盒提取外泌体的方法虽然适用于小体积



A: 差速离心法提取的外泌体的RNA质检结果; B: 试剂盒提取的外泌体的RNA质检结果; C: 改良外泌体提取方法提取的外泌体的RNA质检结果。
A: RNA quality test results of exosomes extracted by differential centrifugation; B: RNA quality test results of exosomes extracted with the kit; C: RNA quality test results of exosomes extracted by improved exosome extraction method.

图4 提取的外泌体内RNA的质检结果

Fig.4 Quality test results of extracted exosome RNA

样本但又有一些局限性, 比如杂质蛋白去除不干净。为了保证外泌体膜能够被柱子吸附, 同时柱子也会吸附细胞器膜等一些杂质。由于试剂盒提取外泌体前期的除杂过程过于简单, 血清这种富含蛋白的体液难以达到理想的除杂效果。因此建议使用试剂盒进行外泌体提取的时候前期需要加上一些除杂的过程, 这样能够保证外泌体的纯度。

改良外泌体提取方法结合了差速超离提取方法中除杂的过程, 同时使用膜吸附柱的方法吸附外泌体的膜, 减少外泌体损失的同时保证了外泌体的含量。针对一些珍贵的少量标本, 推荐使用此方法进行外泌体的富集, 在保证获得外泌体的前提下能够减少杂质的影响, 充分利用珍贵的标本。同时本

实验也验证了外泌体内RNA的质量, 证明本实验对于RNA的提取并无影响。改良外泌体提取方法适用于无法获得充足的样本起始体积进行差速超离的标本, 差速超离的方法是最为经典的提取外泌体的方法, 其引入的杂质最少, 但是不利于珍贵少量标本外泌体的提取, 因此本实验探索出的改良的试剂盒提取方法在不损耗更多外泌体的前提下获得了更纯的外泌体。

有研究发现, 肿瘤细胞分泌的外泌体参与了肿瘤细胞的转移, 通过与骨髓祖细胞的相互作用^[10], 或者是在肿瘤细胞迁移到淋巴结之前直接与淋巴结相互作用^[11], 又或者是通过与周围成纤维细胞的相互作用, 从而增加肿瘤细胞的运动能力^[12]。外泌体作

为细胞间交流的媒介,其作用方式很可能是通过外泌体携带的核酸物质发挥作用,肿瘤细胞和干细胞来源的外泌体都会影响受体细胞基因的表达^[13-15]。外泌体在正常及疾病条件下都发挥着重要的功能,因此对外泌体的研究可以揭示一些生理或病理现象,而选取更合适的外泌体提取方法是进行外泌体实验的最基本保障。本实验探索出的改良外泌体提取方法希望能为进行外泌体实验的研究者们提供一定的思路。目前本实验室已使用该改良外泌体提取方法对骨髓瘤患者血清中的外泌体进行提取,以及对外泌体内的核酸进行提取后送小RNA测序,发现了一些与骨髓瘤疾病发生和进展相关的miRNA。

参考文献 (References)

- Baietti M, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, *et al.* Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 2012; 14(7): 677-85.
- Colombo M, Moita C, Van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, *et al.* Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 2013; 126(Pt 24): 5553-65.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9(6): 654-9.
- Van Niel G, D'angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19(4): 213-28.
- Manier S, Liu CJ, Avet-Loiseau H, Park J, Shi J, Campigotto F, *et al.* Prognostic role of circulating exosomal miRNAs in multiple myeloma. *Blood* 2017; 129(17): 2429-36.
- O'Brien KP, Khan S, Gilligan KE, Zafar H, Lalor P, Glynn C, *et al.* Employing mesenchymal stem cells to support tumor-targeted delivery of extracellular vesicle (EV)-encapsulated microRNA-379. *Oncogene* 2018; 37(16): 2137-49.
- Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
- Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015; 523(7559): 177-82.
- Lotvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D5, Gardiner C6, *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* 2014; doi: 10.3402/jev.v3.26913.
- Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012; 18(6): 883-91.
- Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* 2011; 71(11): 3792-801.
- Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, *et al.* Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 2012; 151(7): 1542-56.
- Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Urbanowicz B, Brański P, *et al.* Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55(7): 808-18.
- Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, *et al.* Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006; 20(5): 847-56.
- Skog J, Wurdinger T, Van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10(12): 1470-6.