

外泌体不同制备方法的综合实验教学实践

李艳伟* 郭春 周南 黄琼 王佳佳 陈静瑶 黄莹莹 沈鑫 于晓敏 沈红英

(浙江大学医学院公共技术平台, 杭州 310058)

摘要 流式细胞术随着单克隆抗体技术和光电技术的快速发展而日趋多元化和多样化。然而, 该技术仍受流式细胞仪检测极限的限制而制约外泌体等细胞外囊泡的分离纯化。该文通过对外泌体样本制备方法的建立和探索, 使流式细胞技术理论与实验教学内容更加直观、更易理解和掌握。该方法包括对流式细胞仪配置及实验参数的优化、外泌体的不同制备方法(超速离心、流式细胞分选)、纳米流式分析鉴定、电镜成像鉴定等步骤。通过对该方法的实践操作, 使学生充分掌握相关的检测技术和数据分析手段, 为流式细胞术在外泌体分选及后续功能研究中提供支撑作用。教学、科研、实践相融合, 极大地激发了学生学习实验技能的兴趣和积极性, 大大提升了学生实验技能水平以及科研创新能力等科研素养, 为新时期全能型科研创新人才的培养提供助力。

关键词 外泌体; 流式细胞术; 超速离心; 综合实验教学

Comprehensive Experimental Teaching Practice on Various Exosome Isolation Methods

LI Yanwei*, GUO Chun, ZHOU Nan, HUANG Qiong, WANG Jiajia, CHEN Jingyao, HUANG Yingying, SHEN Xin, YU Xiaomin, SHEN Hongying

(Core Facilities, School of Medicine Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract FCM (flow cytometry) has become increasingly diverse and versatile with the rapid development of monoclonal antibody technology and optoelectronic technology. However, the isolation and purification of exosomes and other extracellular vesicles have been impeded by the limitations of the detection capabilities of FCM. This study establishes and investigates methods for optimizing exosome sample preparation to enhance the theoretical and practical aspects of FCM teaching, rendering it more intuitive, comprehensible, and feasible. The methods include optimizing FCM configuration and experimental parameters, different exosome isolation methods [ultracentrifugation, FACS (flow cytometric sorting), nanoFCM analysis, and electron microscopy imaging identification]. Through practical application of these methods, students can fully master the relevant detection techniques and data analysis methods, providing support for the application of FCM in exosome isolation and subsequent functional studies. The integration of teaching, research, and practical experience greatly stimulates students' interest and enthusiasm for learning experimental skills, significantly enhancing their experimental skills and research innovation capabilities, contributing to the cultivation of versatile research and innovation talents in the new era.

Keywords exosome; flow cytometry; ultracentrifugation; comprehensive experimental teaching

收稿日期: 2024-02-01

接受日期: 2024-03-26

浙江省自然科学基金分析测试项目(批准号: LTGC23C070003)资助的课题

*通信作者。Tel: 0571-88981662, E-mail: lywei@zju.edu.cn

Received: February 1, 2024

Accepted: March 26, 2024

This work was supported by the Zhejiang Natural Science Foundation Analysis and Testing Project (Grant No.LTGC23C070003)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88981662, E-mail: lywei@zju.edu.cn

外泌体是携带大量来源于亲本细胞且与细胞类似的拓扑结构,直径为30~150 nm的双层膜纳米囊泡^[1-2],透射电镜下形态呈茶托状或扁球状^[3-4]。分化抗原簇9(cluster of differentiation antigen 9, CD9),也被称为特异性膜蛋白。分化抗原簇CD63(cluster of differentiation antigen 63, CD63),也被称为溶酶体相关膜蛋白3(lysosomal-associated membrane protein 3, LAMP3)。CD9和CD63均为外泌体特异性标志蛋白,属于四次跨膜蛋白超家族成员,常用于外泌体特异性表征鉴定^[5]。目前外泌体研究主要集中在对外泌体的功能如载药、“信使”功能的开发研究,但这些研究是以获取高纯度、稳定且可量产的外泌体为前提的^[6],这也是制约外泌体功能研究领域的难题。TANG等^[7]利用不同方法解析了外泌体中miRNA信息,但是方法不同,所获取的外泌体纯度各不相同。可见,由于外泌体来源不同、细胞状态以及分泌途径不同、直径大小不同、载有的标记蛋白不同,因而存在高度的异质性和多样性、易聚集和低折光率的特点,虽然分离纯化外泌体在单颗粒水平进行多参数定量检测仍存在诸多挑战,但该文中的教学实践有望作为学生制备外泌体的教学指导^[8],因此获得高纯度的外泌体,将更有实际意义。

目前广泛用于外泌体分离纯化的方法有超速离心法、超滤法、体积排阻色谱法等,尤以超速离心法为外泌体制备的金标准。用于外泌体鉴定的方法有电镜、WB、粒径等。本次教学实践将以血清外泌体为例,总结不同制备方法及其鉴定方法的基本原理及优缺点,建立不同的制备和鉴定标准流程,为外泌体为主的小颗粒纯化提供教学指导,为外泌体制备和功能研究提供参考。

1 实验原理

1.1 流式细胞分析及分选技术

流式细胞术是结合荧光抗体染色技术,对单个细胞或其他生物粒子进行多参数、快速且定量分析的方法,它具有单细胞水平、多参数、速度快、精度高、准确性好等诸多优点,能够深入细致地获知各细胞亚群的特征和占比,并根据这些特征精确分选获得活的目标细胞或生物颗粒,进行后续的各种分子生物学或功能学实验^[9]。该技术已广泛应用于细胞生物学、免疫学、遗传学、血液学、肿瘤学、

海洋生物以及动植物学等研究领域^[10-11]。流式细胞仪在功能上可以分为分析型流式细胞仪和分选型流式细胞仪两大类。分析型流式细胞仪只能获知细胞的各项属性和特征信息,经检测后细胞样本全部流入废液桶中。而分选型流式细胞仪通过液流充电、压电晶体的高频振荡形成液滴,利用高压电极板实现液滴偏转,最终完成目的细胞或生物颗粒的分选^[12]。

1.2 超速离心法

超速离心法利用离心时间或离心力不同,循环去除大颗粒,最后收集小颗粒如外泌体等。具体步骤:利用低速淘汰死细胞、细胞碎片以及细胞分泌的大囊泡等,收集上清,继续利用100 000 ×g以上的离心力获得外泌体沉淀^[13]。该方法可实现大体积外泌体制备,并且无需标记,方法成熟,因此被广泛使用。但也因离心力不同且循环离心,导致操作重复性差,易造成外泌体的损失。而由于外泌体离心后易聚集成团块的原因,也会造成外泌体损伤^[14]。随着离心时间的增加,外泌体的量也会增加,但离心时间达到4 h后外泌体完整性被破坏导致可溶性蛋白杂质含量增加^[15]。

1.3 纳米流式检测技术

纳米流式检测技术将瑞利散射与鞘液流单分子荧光检测技术相结合,可对单个纳米级生物颗粒的散射信号进行直接检测,涵盖了传统流式细胞仪检测极限(100 nm)盲区,可实现纳米颗粒表征,以及对亚细胞结构(如细胞外囊泡等)的粒径及其分布、颗粒浓度的表征。然而外泌体等生物颗粒微小,因此携带的功能分子有限,所以难以实现多参数同时定量分析^[16]。

1.4 电镜成像技术

透射电镜将电子束投射到试样上,由于碰撞导致电子与试样中的原子方向改变,从而产生立体角散射^[17]。散射角与试样的厚度和密度有关,因明暗度不同而形成图像。透射电镜分辨率高,可实现对0.1~0.2 nm放大倍数为几万~百万倍的超微结构观察,因此,电镜成像技术是纳米颗粒形态及粒径大小等表征的重要手段,尤其适合观察外泌体的形态。负染透射电镜下可观察到具有脂质双层结构的圆形囊泡或茶托状形态的囊泡,这些形态的囊泡往往被定性为外泌体^[18]。冷冻电镜下的外泌体形态更加完美,结构更加稳定^[19]。

2 实验教学课程的设计

2.1 实验教学目的

(1) 掌握外泌体制备的基本操作方法, 掌握超速离心法、流式细胞分选法等方法制备的外泌体纯度和表达差异。(2) 掌握流式细胞术原理, 学会外泌体分选标准流程的设计和优化(包括设置检测通道、画图、设门、阈值参数及大小的选择等), 探索最佳的分选方法。(3) 掌握纳米流式检测技术, 学会纳米流式检测仪的质控以及对外泌体的粒径、浓度、标志蛋白的检测分析方法。(4) 掌握电镜技术原理, 学会电镜样本的制备方法。(5) 培养学生在教学实践中的团队合作能力、扎实的技能理论知识和动手能力、科学创新的思维能力和解决问题的能力, 为成为国家生命健康战略需求关键岗位中从事科学研究、技术研发和转化等方面工作的高素质人才打下基础(图1)。

2.2 实验教学的重点难点

(1) 流式分选制备外泌体方法的建立, 为外泌体纯化制备提供参考。(2) 外泌体粒径、浓度、标志蛋白表达等表征, 为生物小颗粒样本检测提供参考。

2.3 实验材料与仪器

2.3.1 实验材料 成年健康雌性SD大鼠血清由浙江大学基础医学院王琳琳课题组提供; 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)购自上海博伟欣生物科技有限公司; CD9、CD63购自上海优宁维生物科技有限公司; 超离管购自杭州合众生物科技有限公司; 流式管、EP管购自上海普飞生物技术有限公司; 聚苯乙烯微球(PN 3000系列)购自 Thermo-Fisher Scientific公司。

2.3.2 实验仪器 高速流式细胞分选仪(Moflo Astrios EQ)购自美国 Beckman Coulter公司; 流式细

胞仪(CytoFLEX LX)购自美国 Beckman Coulter公司; 落地式超速离心机(XPN-100)购自美国 Beckman Coulter公司; 纳米流式检测仪(U30)购自中国厦门福流生物科技有限公司; Tecnai G2 Spirit 120 kV透射电子显微镜(CCD型Gatan832)购自美国FEI公司。

2.4 实验教学安排

2.4.1 教学学时 本教学课程安排8学时, 重点是激发学生对外泌体流式分选方法的探索和优化的兴趣, 获得最佳分选条件。目前外泌体制备以超离法为最佳, 但循环步骤多、损耗大, 受实验课程学时的限制, 学生无法完整阐述分离原理和操作技巧。流式细胞术尤其流式细胞分选技术相关的仪器检测参数、技术指标多, 需要实验操作人员有扎实的理论基础和操作技能, 仅仅通过课堂上的理论解读和仪器上机培训训练效果不佳, 导致学生对该技术一知半解, 影响科研技能水平的真正提升。

2.4.2 实验课前提前安排 大鼠血清由老师准备好, 每份血清体积为4 mL。动物实验全部通过浙江大学实验动物福利伦理委员会审定(批准号为: #ZJU20240359)。

2.4.3 实验分组 根据实验目的分组, 按照分离方法将学生分成2个大组。在2个大组内根据外泌体鉴定方法不同分2个小组, 每3人分为1个小组(表1)。实验前2周, 教师布置自主设计的实验内容及要求、具体开展时间和考核办法。根据制备方法不同分组, 以组为单位开展课前自主学习理论包括翻阅资料、自主设计分析、准备实验和实施、提交实验结果并开展讨论。课堂上老师讲解外泌体分离原理、实验方案设计、仪器上机操作演示, 评价学生自主设计的实验方案, 然后学生按组开展实验, 协同合作完成实验

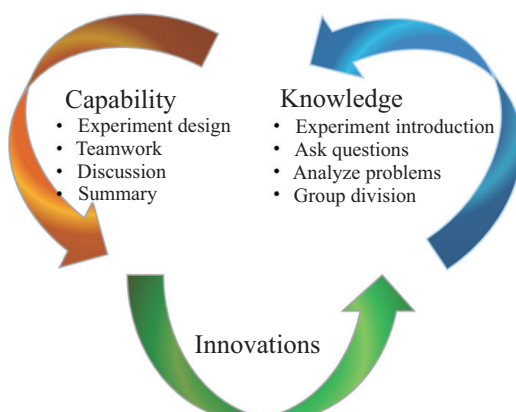


图1 实验技能课程目标评价

Fig.1 Evaluation of experimental skills course objectives

表1 实验分组

Table 1 Groups of the experiment

分类 Types	超速离心法 Ultracentrifugation		流式分选法 FACS	
	NanoFCM	Electron microscopy	NanoFCM	Electron microscopy
Number of students	3	3	3	3

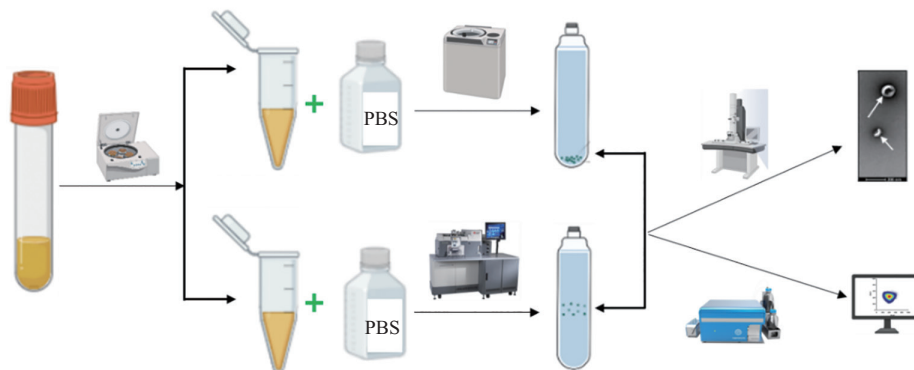


图2 实验技能教学课程实施方案

Fig.2 Implementation plan of experimental skill teaching courses

内容。实验结束后,同组内学生先分享实验结果并分析讨论得出结论,然后不同组学生进一步分享实验结果并分析讨论得出不同方法的特点,最终总结出实验结论和形成实验报告。将教学评估分为课前预习报告(20%)、实验操作(30%)、数据分析(20%)、实验讨论及报告(30%)等方面。实验报告重点阐述外泌体制备方法原理、条件、结果分析及问题解决方法(图2)。

3 实验教学方法

3.1 外泌体制备方法

3.1.1 超速离心法 (1)取4 mL血清在4℃、12 000 ×g离心30 min,弃沉淀吸取上清。(2)上述上清液分为2组,一组用于超速离心法,即以PBS溶液稀释上清至20 mL,过0.22 μm滤膜;另一组用于流式分选法。(3)分装称重,用SW41 Ti转头,4℃、110 000 ×g离心2 h。(4)弃上清,沉淀分别重悬于PBS中,用于外泌体鉴定实验。

3.1.2 流式分选法 (1)分别以FSC、SSC为阈值参数,检测聚苯乙烯微球(50 nm、80 nm、100 nm、200 nm)与背景信号的区分情况,确定合适阈值参数。(2)选择0.02%和0.002%为阈值大小,根据确定的阈值参数继续检测苯乙烯微球(50 nm、80 nm、100 nm、200 nm)与背景信号的区分情况,确定最佳阈值大小。(3)在最佳阈值参数和阈值大小情况下,依次检测不同粒径

大小的苯乙烯微球(50 nm、80 nm、100 nm、200 nm、300 nm、500 nm),借助流式门控来圈定不同粒径微球的位置,以此确定不同粒径外泌体的定位。(4)初离过的血清上清与PBS按照1:5的稀释比例进行稀释,获得血清稀释液。(5)选择FSC Log-SSC Log做流式图,根据不同粒径微球门控为分选条件,选择Single模式分选血清中的外泌体,4℃、20 000 ×g离心20 min,沉淀重悬于PBS中,分装并用于外泌体鉴定实验。

3.2 外泌体的鉴定

3.2.1 透射电镜的形态学观察 分别吸取10 μL两组外泌体的PBS重悬液滴在3 mm铜网上,静置10 min,吸去边缘多余悬浮液,再滴加3%的磷钨酸负染色液10 μL,室温染3 min,吸去负染色液,用戊二醛(2%)室温固定5 min,蒸馏水润洗2次,吸干水后干片于透射电镜下观察外泌体形态并拍照。

3.2.2 纳米流式分析粒径大小、浓度及蛋白表达 分别以粒径标准品和浓度标准品对仪器进行校准,分别将两组外泌体和PBS以1:9的比例稀释,对外泌体粒径和浓度进行纳米流式检测。分别吸取外泌体稀释液与抗大鼠CD9和CD63抗体混匀,37℃孵育30 min,外泌体抗体孵育液与PBS按照1:9比例稀释并上机检测,进一步分析标记蛋白CD9、CD63的表达情况。

3.3 数据统计学分析

两种制备方法的实验数据均采用GraphPad Prism

8.0.2软件分析作图,采用*t*检验分析。纳米流式数据采用NF Profession 2.0软件分析作图。

4 教学实验结果分析讨论

4.1 两种制备方法对外泌体浓度、粒径大小、CD9及CD63表达等的影响

为使学生充分掌握超速离心法和流式分选法两种外泌体制备方法,本实验对同一组大鼠来源的血清样本分别进行了提取制备(图3),并向学生展示了纳米流式数据检测分析策略(表2)、具体检测分析流

程。(1)检测PBS(不含外泌体)。(2)依次检测不同方法制备的外泌体获得外泌体浓度及粒径大小。(3)依次检测外泌体中CD9、CD63两种蛋白的表达情况。(4)分析:以PBS溶液为空白对照,再分别分析两种方法制备的外泌体浓度、粒径大小及蛋白表达情况。
4.1.1 两种制备方法对外泌体浓度的影响 讨论了两种方法对外泌体浓度的影响(图4),结果表明1 mL血清中,超速离心制备的外泌体浓度为 5.26×10^{10} 个/mL,流式分选制备外泌体浓度为 5.57×10^9 个/mL,外泌体浓度呈现显著性差异($P<0.0001$)。

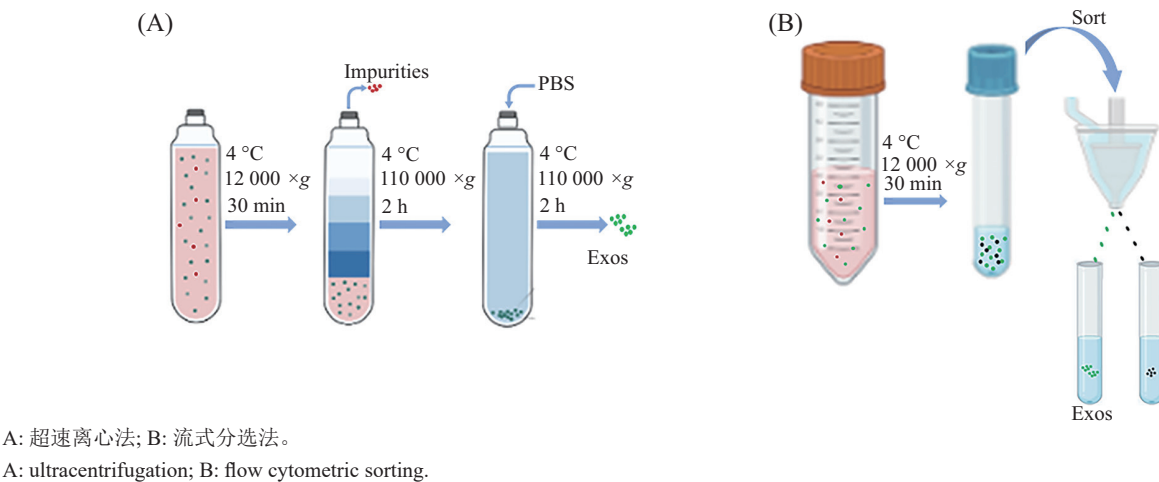


图3 两种Exos制备方法流程示意图
Fig.3 Schematic diagrams of two exosome preparation methods

表2 纳米流式检测方案
Table 2 The panel for Nanoflow cytometry

标志物 Markers	反应种属 Reactive species	荧光素 Fluorochrome	激光器 Laser	滤光片 Filter	货号 Lot No.
CD9	Rat	APC	638	670	206504
CD63	Rat	FITC	488	525	MA541030

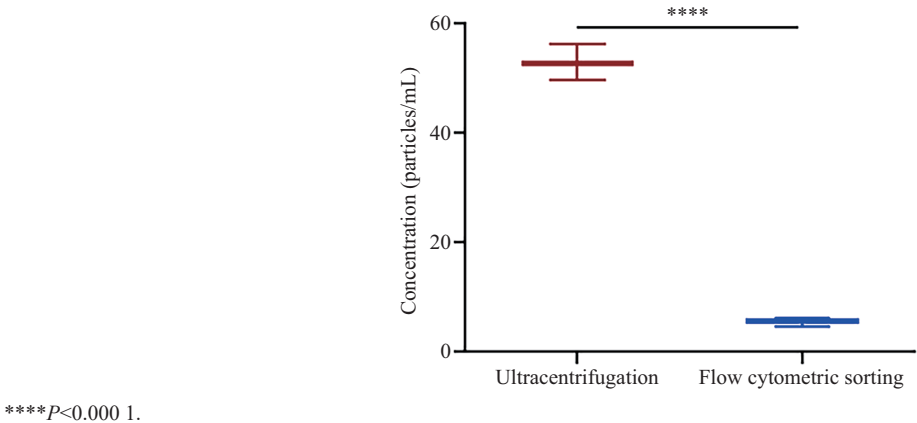
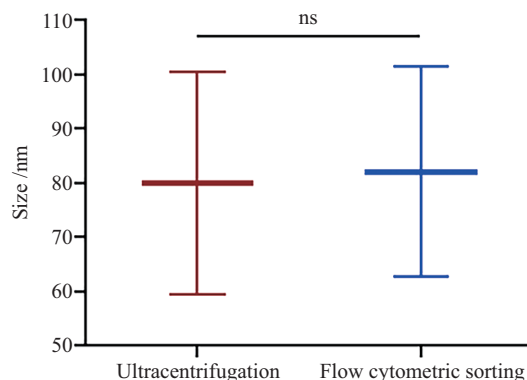


图4 不同方法制备的外泌体浓度比较
Fig.4 Comparison of exosome concentrations prepared by different methods



ns: 差异不显著。

ns: not significant.

图5 不同方法制备的外泌体粒径大小比较

Fig.5 Comparison of exosome particle sizes prepared by different methods

4.1.2 两种制备方法对外泌体粒径大小的影响
基于纳米流式检测不同制备方法获得外泌体的粒径大小(图5), 结果表明超速离心法制备的外泌体大小为 (79.99 ± 20.57) nm, 而流式分选法基于门控框选策略制备的外泌体粒径大小为 (82.10 ± 19.41) nm, 可见两种方法制备的外泌体粒径大小没有统计学差异($P > 0.05$)。

4.1.3 两种制备方法对 CD9、CD63 表达的影响
纳米流式检测两种方法制备的外泌体中 CD9 及 CD63 表达情况(图6A), 结果可知超速离心法制备的外泌体中, CD9 含量为 0.7%, CD63 含量为 0.7%。流式分选法制备的外泌体中, CD9 含量为 3.4%, CD63 含量为 0.9%。可见两种方法制备的外泌体中 CD9 具有统计学差异($P < 0.05$)(图6B), CD63 表达无显著差异($P > 0.05$)(图6C)。

4.2 两种制备方法对外泌体形态的影响

超速离心法和流式分选法分别制备的外泌体于透射电子显微镜下观察发现(图7), 两种方法制备的外泌体形态均呈现茶托状, 大小均为 100 nm 左右。其中, 流式分选法较超速离心法制备的外泌体与背景信号分界清楚、周围杂质少, 表明流式分选法制备的外泌体纯度更高, 进一步说明通过优化流式分选仪的阈值参数和阈值大小可以提高外泌体的纯度。

4.3 超速离心法与流式分选法的实验比较

从表3可知, 超速离心法相较于流式分选法操作步骤简单, 学生容易掌握操作, 但是该方法不能有效去除外泌体中杂蛋白的干扰。而流式分选法相较于超速离心法, 更易获得高纯度的外泌体, 但因流式分选过程主要是分选液滴的过程, 所以造成分选后

外泌体浓度被稀释的情况, 需要进一步高速离心完成外泌体制备, 步骤相对复杂。如果仅仅用于外泌体鉴定, 推荐优选超速离心法。如果将外泌体用于治疗疾病, 推荐优选流式分选法。

5 讨论

阈值决定流式检测信号记录的下限, 低于阈值的信号不被记录, 高于阈值的信号可被记录存储分析。低于阈值的信号可以是细胞碎片、死细胞等, 因此阈值设置过高, 会导致仪器无法识别阈值限以下的死细胞或碎片的干扰, 也会使目标颗粒低于阈值限等, 会影响流式分选的纯度和得率, 对于细胞分选常常选择阈值为 1%, 因外泌体粒径远小于细胞粒径, 细胞分选所用的阈值不适合外泌体等小颗粒检测分选。因此合理设置阈值大小是做好流式分选的关键。

外泌体在细胞与细胞间广泛参与生理及病理等过程。至今, 外泌体的产生过程以及摄取外泌体的过程仍鲜为人知, 且外泌体参与机体调控机理与功能的研究仅为该领域研究中的“冰山一角”^[20]。对于外泌体鉴定仍存在诸多不确定性, 仅有的形态学定性和统计定量分析方法还不够充分, 因此外泌体制备不同于细胞制备, 尤其缺乏稳定获取高纯度外泌体且没有损伤并且操作简便的方案^[21], 这也是该领域目前不断改进的方向。本教学实践对比两种外泌体制备方法, 超速离心法作为外泌体等生物小颗粒制备的金标准, 操作步骤简单, 但是耗时长, 杂蛋白不易去除。而流式分选法可降低操作耗时, 可根据外泌体标志蛋白的表达进行特异分选, 提高了外泌体

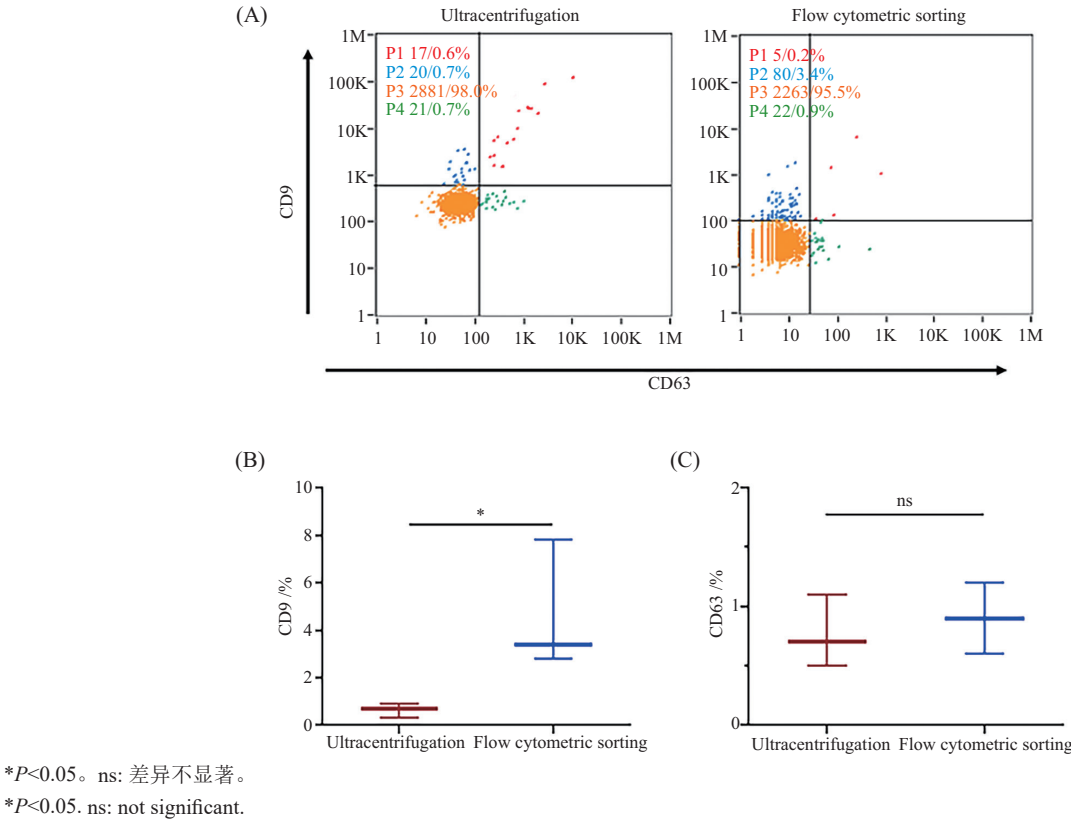


图6 不同方法制备的外泌体CD9及CD63的表达差异

Fig.6 Differential expression of CD9 and CD63 in exosome prepared by different methods

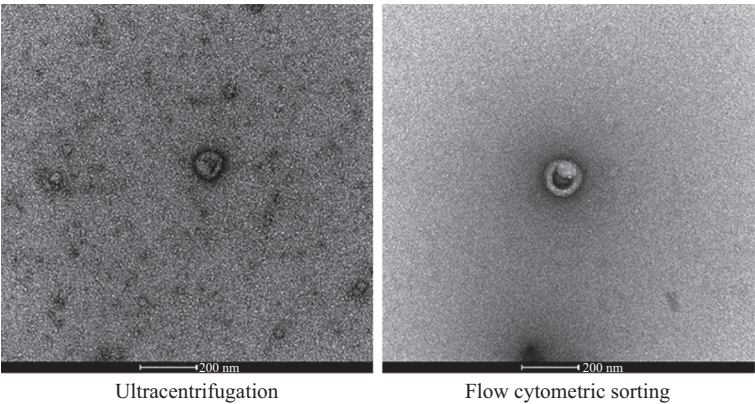


图7 不同方法制备的外泌体形态学观察

Fig.7 Morphological observation of exosome prepared by different methods

纯度, 为外泌体质量的稳控、外泌体的定量分析、外泌体功能的研究等提供了参考^[1]。电镜技术是外泌体形态鉴定的有效手段, 需要经过负染、固定、润洗处理后于静态下观察外泌体形态, 测量外泌体大小, 操作步骤较多且无法定量外泌体浓度。而纳米流式检测技术可对流动状态下单个外泌体颗粒的大小、浓度、特异性标志蛋白CD9、CD36等进行定量检测, 且操作步骤简单。综合比较两种鉴定方法,

纳米流式鉴定结果与电镜观察结果一致, 可作为外泌体鉴定手段, 具有重要的应用价值。

自2020年起, 浙江大学医学院公共技术平台承担基础医学(求是科学班)的实践技能培养, 课程内容涵盖相关实践技能理论学习、实践操作、课题设计及开展答辩等, 尤其注重学生在实践操作过程中对于大型设备组成及工作原理的理解、设备国产趋势及创新的讨论, 增强学生对基础理论知识的掌握

表3 超速离心法与流式分选法的实验比较

Table 3 Comparison of experimental approaches: ultracentrifugation versus FACS

比较类别 Comparative categories	超速离心法 Ultracentrifugation	流式分选法 FACS
Class periods /h	5	2
Procedures	Dilution filtration, ultracentrifuge twice at least	Dilution filtration, sorting, enrichment
Key concepts	Principles and operational processes of ultracentrifugation	Principles and operational processes of FCM
Advantages and disadvantages	Advantages: simple operation Disadvantages: inability to completely eliminate interference from similarly-sized miscellaneous proteins, inability to assess post-centrifugation loss of exosomes	Advantages: collection of specified-sized exosomes based on FCM gate characteristics, further purification utilizing fluorescence labeling Disadvantages: relatively complex operation; additionally, since the sorting of droplets wrapping exosomes, post-sorting dilution of exosomes occurs, necessitating high-speed centrifugation for enrichment

以及科研创新能力,提升教学实践的质量,充分发挥超离技术、流式分选技术、电镜技术、纳米检测技术等对高校科研育人的支撑作用,为培育具备家国情怀的科研及实践创新的综合型顶尖人才提供保障。

参考文献 (References)

- [1] 许永峰, 刘立军, 黄洪斌, 等. 骨质疏松骨折相关血清外泌体的对比分析[J]. 中国现代药物应用(XU Y F, LIU L J, HUANG H B, et al. Comparative analysis of serum exosomes associated with osteoporosis fracture [J]. Chinese Journal of Modern Drug Application), 2021, 15(19): 239-41.
- [2] GUO S, BETZER O, PERETS N, et al. Extracellular vesicles tracking and quantification using ct and optical imaging in rats [J]. Bio Protoc, 2020, 10(11): e3635.
- [3] ZABOROWSKI M P, BALAJ L, BREAKEFIELD X O, et al. Extracellular vesicles: composition, biological relevance, and methods of study [J]. Bioscience, 2015, 65(8): 783-97.
- [4] LOBB R J, BECKER M, WEN S W, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma [J]. J Extracell Vesicles, 2015, 4: 27031.
- [5] MATHIEU M, NÉVO N, JOUVE M, et al. Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9 [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4389.
- [6] 徐艺, 姚月, 余良. 外泌体分离提取技术的研究进展[J]. 湖北理工学院学报(XU Y, YAO Y, YU L. Research progress of exosome isolation and extraction technologies [J]. Journal of Hubei Polytechnic University), 2023, 39(1): 50-4.
- [7] TANG Y T, HUANG Y Y, ZHENG L, et al. Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum [J]. Int J Mol Med, 2017, 40(3): 834-44.
- [8] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [9] MCKINNON K M. Flow cytometry: an overview [J]. Curr Protoc Immunol, 2018, doi: 10.1002/cpim.40.
- [10] GIVAN A L. Flow cytometry: an introduction [J]. Methods Mol Biol, 2011, 699: 1-29.
- [11] D'AMATO FIGUEIREDO M V, ALEXIOU G A, VARTHOLOMATOS G, et al. Advances in intraoperative flow cytometry [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(21): 13430.
- [12] ROBINSON J P. Flow cytometry: past and future [J]. Biotechniques, 2022, 72(4): 159-69.
- [13] CVJETKOVIC A, LÖTVALL J, LÄSSER C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles [J]. J Extracell Vesicles, 2014, doi: 10.3402/jev.v3.23111.
- [14] KONOSHENKO M Y, LEKCHNOV E A, VLASSOV A V, et al. Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 8545347.
- [15] ZERINGER E, BARTA T, LI M, et al. Strategies for isolation of exosomes [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2015, 2015(4): 319-23.
- [16] 吴丽娜, 薛乘风, 田野, 等. 纳米流式检测技术的研发、应用及前景[J]. 厦门大学学报(自然科学版)(WU L N, XUE C F, TIAN Y, et al. Development, application and prospects of nano-flow cytometry [J]. Journal of Xiamen University, Natural Science), 2021, 60(2): 178-90.
- [17] RUZYCKA-AYOUSH M, NOWICKA A M, KOWALCZYK A, et al. Exosomes derived from lung cancer cells: isolation, characterization, and stability studies [J]. Eur J Pharm Sci, 2023, 181: 106369.
- [18] RAPOSO G, NIJMAN H W, STOORVOGEL W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles [J]. J Exp Med, 1996, 183(3): 1161-72.
- [19] CONDE-VANCELLS J, RODRIGUEZ-SUAREZ E, EMBADE N, et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes [J]. J Proteome Res, 2008, 7(12): 5157-66.
- [20] THEODORAKI M N, HONG C S, DONNENBERG V S, et al. Evaluation of exosome proteins by on-bead flow cytometry [J]. Cytometry A, 2021, 99(4): 372-81.
- [21] KURIAN T K, BANIK S, GOPAL D, et al. Elucidating methods for isolation and quantification of exosomes: a review [J]. Mol Biotechnol, 2021, 63(4): 249-66.