

ICS 点击此处添加 ICS 号  
CCS 点击此处添加 CCS 号



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

## 细胞外囊泡体外提取纯化方法评价通则

Extracellular Vesicles In Vitro Diagnostic Systems General Principles for  
Evaluation of Extraction and Purification Methods

草案版次选择

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布

## 目 次

前 言 .....	II
引 言 .....	错误!未定义书签。
1 范围 .....	3
2 规范性引用文件 .....	3
3 术语和定义 .....	3
4 分类 .....	3
5 细胞外囊泡的蛋白质标志物 .....	4
6 概述 .....	4
7 指标参数 .....	5
7.1 形态学 .....	5
7.2 粒径大小分布 .....	5
7.3 蛋白含量 .....	5
7.4 颗粒数 .....	5
7.5 颗粒蛋白比 .....	5
7.6 蛋白标志物 .....	5
7.6.1 蛋白检测方式 .....	5
7.6.2 外泌体 .....	5
7.6.3 来源于细胞核的细胞外囊泡亚群 .....	5
7.6.4 来源于线粒体的细胞外囊泡亚群 .....	6
7.6.5 来源于内质网的细胞外囊泡亚群 .....	6
7.6.6 来源于高尔基体的细胞外囊泡亚群 .....	6
7.6.7 来源于自噬小体的细胞外囊泡亚群 .....	6
附 录 A （资料性） 扫描电子显微镜 .....	7
附 录 B （资料性） 透射电子显微镜 .....	8
附 录 C （资料性） 动态光散射 .....	9
附 录 D （资料性） 纳米颗粒跟踪分析 .....	10
附 录 E （资料性） 紫外-可见分光光度法 .....	11
附 录 F （资料性） BCA 法蛋白浓度测定方法 .....	12
附 录 G （资料性） 考马斯亮蓝法（Bradford 法） .....	13
附 录 H （资料性） 纳米流式检测法 .....	14
附 录 I （资料性） 免疫印迹 .....	15
参 考 文 献 .....	18

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

# 细胞外囊泡体外诊断系统 提取纯化方法评价通则

## 1 范围

本文件建立了细胞外囊泡体外诊断系统的提取纯化方法评价通则。  
本文件适用于实验室对于人体样品或者人细胞培养物中细胞外囊泡的鉴定。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 细胞外囊泡 **extracellular vesicles**

从细胞释放出来的、由脂质双分子层包裹的、不能自行复制的颗粒。

### 3.2

#### 外泌体 **exosomes**

小型细胞外囊泡的一种亚型，直径通常小于 200nm，来源于细胞的内体系统。

### 3.3

#### 凋亡小体 **apoptotic bodies**

细胞在凋亡过程中，细胞萎缩碎裂形成的有膜包裹的含有细胞质和细胞器的泡状小体，粒径分布范围比较广。

### 3.4

#### 动态光散射 **dynamic light scattering, DLS**

一种快速测量溶液中亚微米级颗粒的平均水合粒径及其分布的常规方法，可用于细胞外囊泡的粒径分布测定。

### 3.5

#### 纳米颗粒跟踪分析 **nanoparticle tracking analysis, NTA**

一种利用光学显微镜技术直接观察和分析纳米颗粒在液体中的行为的方法，可用于测定样本中细胞外囊泡颗粒的粒径分布和浓度。

## 4 分类

根据生物特性和形成过程不同，细胞外囊泡主要分为外泌体、微囊泡、凋亡小体等。这些由不同机制产生的细胞外囊泡亚型并不能被大多数分离技术富集，也没有特定的表征和分子标志物。所以本标

准基于蛋白标志物进行细胞外囊泡亚群分类。

细胞外囊泡来源不同，其蛋白标志物有所差异。因此，根据细胞外囊泡蛋白质标志物的不同，我们将细胞外囊泡分为以下亚群：外泌体、来源于细胞核的细胞外囊泡亚群、来源于线粒体的细胞外囊泡亚群、来源于内质网的细胞外囊泡亚群、来源于高尔基体的细胞外囊泡亚群、来源于自噬小体的细胞外囊泡亚群。

## 5 细胞外囊泡的蛋白质标志物

### 5.1 细胞质膜或内体相关膜蛋白：

- (1) 多跨膜蛋白：四跨膜蛋白（CD9, CD63, CD81, CD82），其它跨膜蛋白（CD47, GNA 家族, TSAP6）。
- (2) 单跨膜蛋白：主要组织相容性复合体蛋白（MHC-1/MHC-II 家族），整合素（ITGA/ITGB 家族），铁蛋白受体（TGR2），溶酶体相关膜蛋白（LAMP1/2），硫酸肝素蛋白聚糖（SDC 家族, BSG, ADAM10）。
- (3) 锚定蛋白：糖基磷脂酰肌醇连接蛋白（GPC1），5'核苷酸酶 CD73（NT5E），补体结合蛋白 CD59。

### 5.2 细胞外囊泡中的细胞质蛋白：

- (1) 脂质或膜蛋白结合蛋白：内体分选复合物家族（TSG101, CHMP 家族），辅助蛋白：ALIX（PDCD6IP），VPS4A/B, ARRD1, 浮舰蛋白 Flotillins（FLOT1/2），窖蛋白 caveolins（CAV 家族），衔接蛋白 syntenin（SDCBP）。
- (2) 热休克蛋白 HSC70（HSPA8）和 HSP84（HSP90AB1）。
- (3) 细胞骨架：肌动蛋白 actin（ACT 家族），微管蛋白（TUB 家族）。
- (4) 酶：三磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）。

### 5.3 细胞外囊泡亚群分类相关蛋白：

- (1) 细胞核蛋白：组蛋白（HIST1H 家族），核纤层蛋白（LMNA/C）。
- (2) 线粒体蛋白：电压依赖性阴离子通道蛋白（VDAC），细胞色素 C（CYC1），线粒体外膜转位酶（TOMM20）。
- (3) 内质网蛋白：钙连蛋白（CANX），葡萄糖调节蛋白 Grp-94（HSP90B1），结合免疫球蛋白 BIP（HSPA5）。
- (4) 高尔基体蛋白：高尔基体基质蛋白 GM130（GOLGA2）。
- (5) 自噬小体，细胞骨架蛋白：微管关联蛋白 LC3（MAP1LC3A），肌动蛋白 1/4（ACTN1/4）。

## 6 概述

细胞外囊泡存在于多种体液中，几乎所有的细胞都能够分泌。其内部包含了多种生物活性成分，如

蛋白，核酸，脂类和代谢物等。细胞外囊泡通过参与细胞间通信、细胞增殖、细胞迁移、血管新生、免疫调节等过程，对机体的生理和病理发挥着重要的调节作用。

与传统的生物标志物相比，细胞外囊泡有着更优的稳定性和更多的信息量且广泛存在于体液中易于获取，因此在疾病诊断领域受到极大的关注。目前细胞外囊泡研究面临的挑战之一是——分离/表征技术众多，且还未形成统一的评价标准。标准化的研究方法和结果能够使得不同学科的研究者更好地理解和应用细胞外囊泡的研究成果，促进跨学科的合作和创新，推动相关领域的协同发展。

常规的用于细胞外囊泡提取的样本主要包括新鲜的血浆、血清、尿液、泪液，唾液，粪便和细胞培养液样本等。宜选用新鲜样本进行细胞外囊泡的提取；若不能马上提取，应分装成小份，按照样本特性与采集情况妥善保存。

## 7 指标参数

### 7.1 形态学

在扫描电子显微镜（附录A）和透射电子显微镜（附录B）下，细胞外囊泡图像常呈现碟形或茶托状形态。

### 7.2 粒径大小分布

使用动态光散射（附录C）和纳米颗粒跟踪分析（附录D）技术测定细胞外囊泡的粒径大小分布，峰值在30 -200 nm的范围内。

### 7.3 蛋白含量

可通过紫外-可见分光光度法（附录E）、2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸法（BCA法）（附录F）、考马斯亮蓝法（Bradford法）（附录G）进行检测。

### 7.4 颗粒数

通过纳米颗粒跟踪分析（附录D）和纳米流式（附录I）检测细胞外囊泡颗粒数浓度（particles/mL）。

### 7.5 颗粒蛋白比

按照细胞外囊泡颗粒数浓度（particles/mL）与蛋白含量（ $\mu\text{g/mL}$ ）的比值进行计算。

### 7.6 蛋白标志物

#### 7.6.1 蛋白检测方式

通过纳米流式（附录I）、蛋白质印迹（附录J）、酶联免疫吸附（附录K）测定细胞外囊泡的蛋白质组成。

#### 7.6.2 外泌体

需同时满足CD9、CD63以及CD81任意两个表达阳性；ALIX、TSG101任意一个表达阳性；CANX、HIST1H家族以及GOLGA2任意两个表达阴性。

#### 7.6.3 来源于细胞核的细胞外囊泡亚群

除满足细胞外囊泡均存在的蛋白标志物阳性表达外，还需满足细胞核蛋白阳性表达。

#### 7.6.4 来源于线粒体的细胞外囊泡亚群

除满足细胞外囊泡均存在的蛋白标志物阳性表达外，还需满足线粒体蛋白阳性表达。

#### 7.6.5 来源于内质网的细胞外囊泡亚群

除满足细胞外囊泡均存在的蛋白标志物阳性表达外，还需满足内质网蛋白阳性表达。

#### 7.6.6 来源于高尔基体的细胞外囊泡亚群

除满足细胞外囊泡均存在的蛋白标志物阳性表达外，还需满足高尔基体蛋白阳性表达。

#### 7.6.7 来源于自噬小体的细胞外囊泡亚群

除满足细胞外囊泡均存在的蛋白标志物阳性表达外，还需满足自噬小体、细胞骨架蛋白阳性表达。

附 录 A  
(资料性)  
扫描电子显微镜

### A.1 原理

SEM 采用聚焦电子束对 EVs 外膜表面进行逐点扫描，扫描电子和样本中的原子产生相互作用，激发样本表面放出二次电子，其发射量随样本形状而变化；通过对二次电子的收集转化，即可得到 EVs 的表面结构成像信息。

### A.2 试剂：

固定液：2%戊二醛溶液，脱水液：不同浓度的乙醇溶液，金属镀膜材料：金或铂。

### A.3 耗材：

离心机、金属镀膜机、移液器、铜网或铝基片或硅基片、滤纸、吸头、EP 管、镊子等。

### A.4 检测方法：

#### A.4.1 样本准备：

A.4.1.1 取样与溶解：将提供的细胞外囊泡样本从-80℃冰箱取出后置放于冰盒中，溶解后振荡混匀离心。

A.4.1.2 样本调整：根据样本情况，将样本调整至合适浓度或黏度，以利于后续的制样和观察。

#### A.4.2 样本制备：

A.4.2.1 固定：根据实验需要，可将细胞外囊泡样本与 2%戊二醛溶液混合进行固定，固定时间为 30-120 分钟。

A.4.2.2 脱水：使用不同浓度的乙醇（如 30%、50%、70%、90%、100%）对固定后的样本进行逐级脱水，每次脱水时间约为 10-15 分钟。

A.4.2.3 临界点干燥：将脱水后的样本进行临界点干燥，以去除乙醇并使样本完全干燥，常用二氧化碳作为临界点干燥剂。

A.4.2.4 镀膜：在干燥后的样本表面镀一层金属膜，如金或铂，以增强电子密度和导电性，便于后续的观察。

#### A.4.3 观察与拍照

A.4.3.1 扫描电子显微镜观察：将制备好的样品放入扫描电子显微镜中进行观察，根据样品特性和仪器型号调整参数，一般包括加速电压、工作距离、扫描速度等。SEM 能够提供细胞外囊泡的表面形貌和结构信息。

A.4.3.2 图像采集：调整显微镜参数以获得最佳图像，记录细胞外囊泡的形态特征，如大小、形状、膜结构等，并保存图片，以便后续分析和记录。

**附 录 B**  
**(资料性)**  
**透射电子显微镜**

**B.1 原理:**

将经加速和聚集的电子束透射到非常薄的样品上,电子与样品中的原子碰撞而改变方向,从而产生立体角散射。散射角的大小与样品的密度、厚度等相关,因此可形成明暗不同的影像,影像在放大、聚焦后在成像器件(如荧光屏、胶片以及感光耦合组件)上显示出来。在使用 TEM 对 EVs 进行负染,以突出 EVs 的脂质膜结构。

**B.2 试剂:**

固定液: 2%戊二醛溶液, 染色液: 2%醋酸双氧铀溶液, 超纯水。

**B.3 仪器耗材:**

离心机、移液器、铜网、滤纸、吸头、EP 管、镊子等。

**B.4 检测方法:****B.4.1 样本准备:**

**B.4.1.1 取样与溶解:** 将提供的细胞外囊泡样本从-80℃冰箱取出后置放于冰盒中,溶解后振荡混匀离心。

**B.4.1.2 样本调整:** 根据样本情况,将样本调整至合适浓度或黏度,以利于后续的制样和观察。

**B.4.2 样本制备:**

**B.4.2.1 固定:** 根据实验需要,可将细胞外囊泡样本与 2%戊二醛溶液混合进行固定,固定时间为 30-120 分钟。

**B.4.2.2 铜网处理:** 使用移液枪吸取约 10 $\mu$ L 的细胞外囊泡样本,滴于铜网上,静置 2-10 分钟。夹取铜网时要轻,防止铜网夹破。

**B.4.2.3 吸干样本:** 使用滤纸将铜网上的细胞外囊泡样本吸干。

**B.4.2.4 染色:** 吸取约 10 $\mu$ L 的 2%醋酸双氧铀染色液,在室温下对铜网上的样本进行染色约 1 分钟。若铜网可见较明显吸附物,可用纯水滴加表面,快速吸去,反复几次清洗。

**B.4.2.5 风干样本:** 再次使用滤纸将铜网上的细胞外囊泡样本吸干,将染色完成的样本风干。

**B.4.3 观察与拍照:**

**B.4.3.1 透射电镜观察:** 将制备好的样品放入透射电镜中进行观察,调整电子显微镜的参数,如加速电压、放大倍数等,以获得清晰的细胞外囊泡图像。

**B.4.3.2 图像采集:** 在观察过程中,对感兴趣的区域进行拍照,记录细胞外囊泡的形态特征,如大小、形状、膜结构等,并保存图片,以便后续分析和记录。

## 附录 C

### (资料性)

### 动态光散射

#### C.1 原理

动态光散射测量颗粒的粒径是基于光的散射和布朗运动。当光通过一个悬浮有颗粒物的液溶液时，会与溶液中的颗粒发生散射。颗粒的大小和浓度决定了散射强度的分布情况。通过测量散射光的强度变化，推断颗粒的大小和分布

以下以英国马尔文仪器有限公司生产的 Zetasizer Nano ZS 激光粒度仪为例，说明实验过程

#### C.2 样本制备

将细胞外囊泡样本分散于 PBS 或其它合适的分散液中，配制样本浓度匹配所用动态光散射仪的散射光强度检测范围。

#### C.3 将样品池清洗干净并干燥。

C.3.1 用于稀释细胞外囊泡的溶液（如 PBS）用 0.2  $\mu\text{m}$  以下滤膜过滤，消除稀释液对样品信号的影响。

C.3.2 用滤过的 PBS 淋洗样品池三次以上。

C.3.3 将样品溶液用合适孔径的滤膜过滤至样品池。样品溶液的液面高度应该在 1.5 cm 以上。滤膜大小是根据待测纳米粒子的最大直径以及在滤膜上的吸附情况决定的。实验过程应当保证待测颗粒不被除去

#### C.4 上机检测

C.4.1 打开仪器，预热 30 min，使激光稳定。

C.4.2 检查样品池，确保样品窗未吸附气泡。如果有气泡，再插入仪器前，轻敲样品池，释放气泡。

C.4.3 设置测量温度。一般实验在 25.0°C 下进行，测量前，将温度调至 25.0°C，保温 2 min。

C.4.4 每个样品测量 3 次。

C.4.5 测量结束后，立即将样品倒出，且用过滤的去离子水冲洗样品池。

## 附录 D (资料性) 纳米颗粒跟踪分析

### D.1 原理

纳米颗粒跟踪分析 (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA), 是对每个颗粒的布朗运动进行追踪和分析, 结合 Stokes-Einstein 方程式计算出纳米颗粒的流体力学直径和浓度

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

D = 扩散速度,

k = 波尔兹曼常数,

T = 绝对温度,

$\eta$  = 黏度,

$D_H$  = 流体力学直径

### D.2 样本制备

将细胞外囊泡样本分散于 PBS 或其它合适的分散液中, 配制浓度应该在所选择的 NTA 测量仪器的线性范围内, 通常为  $10^6$ - $10^7$  个/mL

### D.3 上机检测 (以德国 Particle Metrix 公司所生产的 Zetaview 为例)

D.3.1 仪器初始化后, 执行自动清洗流程。清洗完成后, 如果仪器检测界面内显示有气泡或颗粒污染物, 在清洗瓶里更换新鲜、干净的水, 再次冲洗样品池流路, 也可以用注射器吸取新鲜干净的水, 直接冲洗样品池, 至检测界面内的颗粒数小于 10。

D.3.2 确认样品池清洗干净后, 使用含有 100 nm 聚苯乙烯微球的标准液注入样品池, 进行仪器的校准。

D.3.3 用纯水冲掉样品池内的标准液, 直至纯水充满样品池时, 软件检测界面显示的颗粒数小于 10, 仪器才能用于样品测试。

D.3.4 将样本注射到样品池测试样品, 软件界面显示的样品颗粒数目应该在 50-400 之间, 最好在 200 左右, 否则需要调整样品的稀释倍数。

D.3.5 仪器使用完毕后, 先用缓冲液冲洗样品, 直至软件检测界面内显示的颗粒数小于 10; 再用 5 mL 以上的纯水冲洗样品池, 直到检测界面内的颗粒数小于 5; 最后向样品池内注入 5 mL 以上的空气, 将样品池内的纯水冲洗干净。

附 录 E  
(资料性)  
紫外-可见分光光度法

### E.1 原理

由于蛋白质分子中常含酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸等苯环结构,在紫外280nm波长处有最大吸收峰,其吸收值与蛋白质浓度成正比,故可用280nm波长吸收值大小来测定蛋白质含量。

### E.2 检测方法

- 1) 取供试品溶液,按照紫外-可见分光光度法,在280nm的波长处测定吸光度,以吸收系数法或对照品比较法计算供试品中蛋白质的含量。
- 2) 取供试品溶液,照紫外-可见分光光度法,在280nm与260nm的波长处测定吸光度,按下式计算供试品中蛋白质的含量。

蛋白浓度 (mg/mL) =  $1.5 \times A_{280} - 0.75 \times A_{260}$ ;

#### E.2.1 吸收系数法

按各品种项下的方法配制供试品溶液,在规定的波长处测定其吸光度,再以该品种在规定条件下的吸收系数计算含量。用本法测定时,吸收系数通常应大于100,并注意仪器的校正和检定。

#### E.2.2 对照品比较法

按各品种项下的方法,分别配制供试品溶液和对照品溶液,对照品溶液中所含被测成分的量应为供试品溶液中被测成分规定量的 $100\% \pm 10\%$ ,所用溶剂也应完全一致,在规定的波长处测定供试品溶液和对照品溶液的吸光度后,按下式计算供试品中被测溶液的浓度:

$$CX = (AX/AR)/CR$$

式中 CX 为供试品溶液的浓度;

AX 为供试品溶液的吸光度;

CR 为对照品溶液的浓度;

AR 为对照品溶液的吸光度。

附 录 F  
(资料性)  
BCA法蛋白浓度测定方法

### F.1 原理

本法系依据蛋白质分子在碱性溶液中将 $\text{Cu}^{2+}$ 还原为 $\text{Cu}^+$ ，2,2'-联啉啉-4,4'-二羧酸(BCA)与 $\text{Cu}^+$ 结合形成紫色复合物，在一定范围内其颜色深浅与蛋白质浓度成正比，以蛋白质对照品溶液作标准曲线，采用比色法测定供试品中蛋白质的含量。

### F.2 试剂配制

BCA工作液：取2,2'-联啉啉-4,4'-二羧酸钠1g，无水碳酸钠2g，酒石酸钠0.16g，氢氧化钠0.4g与碳酸氢钠0.95g，加水使溶解成100ml，调节pH值至11.25，作为甲液；另取4%硫酸铜溶液作为乙液。临用前取甲液100mL，加入乙液2mL，混匀，即得。

### F.3 检测方法

F.3.1 通常采用血清白蛋白(牛)对照品根据需求配置成不同梯度浓度。(参照药典对照品溶液取用量可在本法测定范围内进行适当调整)

F.3.2 取各浓度的标准蛋白液及待测样品20  $\mu\text{L}$ 加入96孔板中，向各孔的蛋白液中加入200  $\mu\text{L}$ 的BCA工作液混匀，37度放置30分钟。

F.3.3 静置结束后，冷却至室温，用酶标仪测定562 nm处的吸光度。

F.3.4 以加入0 $\mu\text{L}$ 标准品的孔为空白对照，再将各个点的吸光度减去空白值，计算线性回归方程，从线性回归方程计算待测样品溶液中的蛋白质浓度，并乘以稀释倍数，即得。

附 录 G  
(资料性)  
考马斯亮蓝法 (Bradford法)

### G.1 原理

本法系依据在酸性溶液中考马斯亮蓝G250与蛋白质分子中的碱性氨基酸(精氨酸)和芳香族氨基酸结合形成蓝色复合物,在一定范围内其颜色深浅与蛋白质浓度成正比,以蛋白质对照品溶液作标准曲线,采用比色法测定供试品中蛋白质的含量。

### G.2 试剂配制

G250染液:取考马斯亮蓝G250 0.1g,加乙醇50ml溶解后,加磷酸100ml,加水稀释至1000ml,混匀。滤过,取滤液,即得。本试剂应置棕色瓶内,如有沉淀产生,使用前需经滤过。

### G.3 检测方法

G.3.1 通常采用血清白蛋白(牛)对照品根据需求配置成不同梯度浓度。(参照药典对照品溶液取用量可在本法测定范围内进行适当调整)

G.3.2 取各浓度的标准蛋白液及待测样品10 $\mu$ L加入96孔板中,向各孔的蛋白液中加入200 $\mu$ L的G250染液,立即混匀。

G.3.3 并立即在595nm的波长处测定吸光度。

G.3.4 以加入0 $\mu$ L标准品的孔为空白对照,再将各个点的吸光度减去空白值,计算线性回归方程,从线性回归方程计算待测样品溶液中的蛋白质浓度,并乘以稀释倍数,即得

## 附录 H

### (资料性)

### 纳米流式检测法

#### H.1 原理

当被测颗粒通过激光检测区时，颗粒被激光照射产生散射光和荧光信号。通过一系列光学元件收集并分离散射光和各波段的荧光信号，经过电学系统中的信号转换和数据处理，获得颗粒的大小，粒度，以及特定蛋白的水平。

#### H.2 样本制备

H.2.1 将细胞外囊泡样本分散于合适的分散液中，配制浓度与标准品（荧光微球）接近的样本浓度范围。

H.2.2 准备分散液作为空白对照

H.2.3 选择与细胞外囊泡折射率接近，不同尺寸的二氧化硅微球作为粒径标品

#### H.3 上机检测

H.3.1 打开仪器，进行系统和液流的初始化，并运行排除气泡程序。

H.3.2 使用质控微球进行光路的校准，进行信号强度和均一性的调整。

H.3.3 通过检测特定时间内已知浓度荧光微球的个数，计算待测样本中颗粒的浓度。通过检测不同粒径标品微球的散射信号强度，建立粒径与散射信号强度的标准工作曲线，计算相同检测条件下，待测样本粒径的分布。

H.3.4 进行空白对照溶剂以及待测样品的检测。

H.3.5 测量结束后，清洗液路，关闭仪器。

## 附录 I (资料性) 免疫印迹

### 1.1 原理

免疫印迹 (immunoblotting) 又称蛋白质印迹 (Western blotting), 是根据抗原抗体的特异性结合检测复杂样品中的某种蛋白的方法。该法是在凝胶电泳和固相免疫测定技术基础上, 发展起来的一种免疫生化技术。免疫印迹常用于鉴定某种蛋白, 并能对蛋白进行定性和半定量分析。结合化学发光检测, 可以同时比较多个样品同种蛋白的表达量差异。

### 1.2 仪器装置

恒压或恒流电源、垂直板或圆盘电泳槽和制胶模具。

### 1.3 试剂

水电阻率不低于 18.2MΩ·cm。

A 液: 1.5mol/L 三羟甲基甲烷-盐酸缓冲液。称取三羟甲基氨基甲烷 18.15g, 加适量水溶解, 用盐酸调 pH 值至 8.8, 加水稀释至 100mL。

B 液: 30%丙烯酰胺溶液-0.8% N, N'-亚甲基双丙烯酰胺溶液 (避光保存)。

C 液: 1%十二烷基硫酸钠溶液。

D 液: 10% N,N,N',N'-四甲基乙二胺。

E 液: 10%过硫酸铵溶液, 临用前配制。

F 液: 0.5mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液。称取三羟甲基氨基甲烷 6.05g, 加适量水溶解, 用盐酸调 pH 值至 6.8, 加水稀释至 100mL。

电极缓冲液: 称取三羟甲基氨基甲烷 3g、甘氨酸 14.4g、十二烷基硫酸钠 1g, 加适量水溶解, 用盐酸调 pH 值至 8.3, 加水稀释至 1000mL。

供试品缓冲液: 称取三羟甲基氨基甲烷 0.303g、溴酚蓝 2mg、十二烷基硫酸钠 0.8g, 量取盐酸 0.189mL、甘油 4mL, β-巯基乙醇 2mL, 加水溶解并稀释至 10mL。

分子量标准品: 所选用的标准品的分子量范围应将供试品的分子量包括在其中。

供试品溶液: 将供试品与供试品缓冲液按 3:1 的比例混匀, 除另有规定外, 置水浴中 100℃加热 3~5 分钟, 对照品/标准品溶液同法操作。

### 1.4 测定法

1.4.1 制备分离胶溶液 根据不同分子量的需求, 按下表制成分离胶溶液, 灌入模具内至一定高度, 加水封顶, 室温下聚合 (室温不同, 聚合时间不同)。

凝胶种类	分离胶溶液	浓缩胶溶液
------	-------	-------

凝胶浓度		5%	7.5%	10%	12.5%	15%	17.5%	4.5%
试剂/ml	A 液	4	4	4	4	4	4	
	B 液	2.7	4	5.4	6.7	8	9.4	1.35
	C 液	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	0.9
	D 液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.07
	E 液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.07
	F 液							2.25
	G 液	7.3	6	4.88	3.3	2.28	0.88	4.33

#### 1.4.2 制备浓缩胶溶液

待分离胶溶液聚合后，用滤纸吸去上面的水层，再灌入浓缩胶溶液（配方见上表），插入样品梳，注意避免气泡出现。

#### 1.4.3 加样

待浓缩胶溶液聚合后小心拔出样品梳，将电极缓冲液注满电泳前后槽，在加样孔中加入供试品溶液与对照/标准品溶液。

#### 1.4.4 电泳

垂直板电泳：恒压电泳，初始电压为 80V，进入分离胶时调至 150~200V，当溴酚蓝迁移胶底处，停止电泳。或恒流电泳，以恒流 10mA 条件下开始电泳，至供试品溶液进入分离胶后将电流调至 20mA，直至电泳结束。

圆盘电泳：调节电流使每管 8mA。

#### 1.4.5 转膜

电泳结束后，将切好的胶置于转膜缓冲液中，从负极到正极按海绵、滤纸、PVDF 膜、胶、滤纸和海绵的顺序安装转膜所需模型，叠好夹紧后放入槽内，加入适量转膜缓冲液，调节转膜条件为电流 300 mA，冰浴条件下转膜 120 min。

封闭：转膜结束后将 PVDF 膜取出，PBST 中漂洗浸泡在 5%的 BSA 封闭液中室温封闭 1 h。

孵育一抗：封闭结束后，用漂洗 PVDF 膜。使用含有 1% BSA 的 PBST 对一抗进行适当稀释，将 PVDF 膜转移至一抗中，4℃下摇床孵育过夜或常温 2 h。

洗涤：将孵育完一抗的 PVDF 膜于 TBST 中漂洗。

孵育二抗：加入的二抗（含有 1% BSA 的 PBST 对其进行稀释），避光室温下摇床孵育 2 h。

洗涤：将孵育完二抗的 PVDF 膜于 PBST 中漂洗，随后用超纯水漂洗 PVDF 膜，置于超纯水中备用。

曝光显色：按照灵敏化学发光检测试剂盒说明书，将显影液 A、B 液按照 1:1 的比例混匀，滴于膜

上，按照仪器说明书，于化学发光成像系统上曝光观察，采集照片。

## 参 考 文 献

- [1] 中国研究型医院学会细胞外囊泡研究与应用专业委员会,中华医学会检验医学分会分子诊断学组.细胞外囊泡分离与检测技术专家共识[J].中华检验医学杂志,2024,47(08):852-863.DOI:10.3760/cma.j.cn114452-20240528-00278.
- [2] 中国研究型医院学会细胞外囊泡研究与应用专业委员会微生物细胞外囊泡专家工作组,广东省精准医学应用学会细胞外囊泡分会.细菌细胞外囊泡命名与分离检测中国专家共识[J].中华医学杂志,2024,104(31):2910-2927.DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20240104-00030.
- [3] Welsh J A, Goberdhan D C I, O'Driscoll L, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches[J]. *Journal of extracellular vesicles*, 2024, 13(2): e12404.
- [4] 王前,郑磊.细胞外囊泡:基础研究与临床应用[M].科学出版社,2019.
- [5] Shao H, Im H, Castro CM, Breakefield X, Weissleder R, Lee H. New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem Rev*. 2018 Feb 28;118(4):1917-1950.
- [6] Tkach M, Clotilde Théry. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go[J]. *Cell*, 2016, 164(6):1226-1232.DOI:10.1016/j.cell.2016.01.043.
- [7] Tian Y, Gong M, Hu Y, Liu H, Zhang W, Zhang M, Hu X, Aubert D, Zhu S, Wu L, Yan X. Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle isolation methods by nano-flow cytometry. *J Extracell Vesicles*. 2019 Nov 29;9(1):1697028.
- [8] Tan M, Ge Y, Wang X, Wang Y, Liu Y, He F, Teng H. Extracellular Vesicles (EVs) in Tumor Diagnosis and Therapy. *Technol Cancer Res Treat*. 2023 Jan-Dec;22:15330338231171463.
- [9] Sheridan C. Exosome cancer diagnostic reaches market. *Nat Biotechnol*. 2016 Apr;34(4):359-60.
- [10] Dong L, Zieren RC, Horie K, Kim CJ, Mallick E, Jing Y, Feng M, Kuczler MD, Green J, Amend SR, Witwer KW, de Reijke TM, Cho YK, Pienta KJ, Xue W. Comprehensive evaluation of methods for small extracellular vesicles separation from human plasma, urine and cell culture medium. *J Extracell Vesicles*. 2020 Dec;10(2):e12044.
- [11] Patel GK, Khan MA, Zubair H, Srivastava SK, Khushman M, Singh S, Singh AP. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Sci Rep*. 2019 Mar 29;9(1):5335.
- [12] Willms E, Johansson HJ, Mäger I, Lee Y, Blomberg KE, Sadik M, Alaarg A, Smith CI, Lehtiö J, El Andaloussi S, Wood MJ, Vader P. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep*. 2016 Mar 2;6:22519.
- [13] Willms E, Johansson HJ, Mäger I, Lee Y, Blomberg KE, Sadik M, Alaarg A, Smith CI, Lehtiö J, El Andaloussi S, Wood MJ, Vader P. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and

biological properties. *Sci Rep.* 2016 Mar 2;6:22519.

[14] McAndrews KM, Kalluri R. Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer. *Mol Cancer.* 2019 Mar 30;18(1):52.