

外泌体超离纯化指南



背景

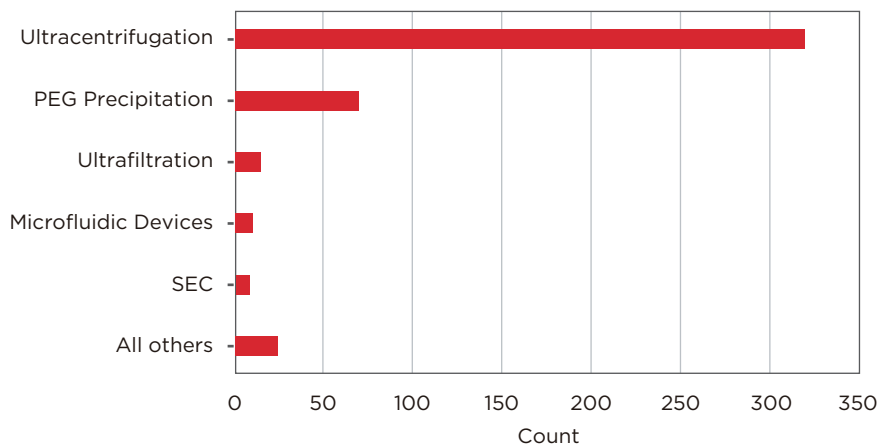
细胞外囊泡(EVs)是由脂质双分子层包裹的纳米颗粒。EVs能够携带多种货物，在生理过程中和细胞间通讯中都发挥着重要的作用。所有活细胞都会自然分泌EVs，只是其生理来源和直径不同。外泌体、微囊泡和凋亡小体均为EVs¹。而外泌体作为生物标志物和潜在的治疗方法在临床上显示出巨大的应用前景²⁻⁴。

挑战

由于外泌体在大小、组成和功能方面具有多样的异质性，许多外泌体分离技术，由于纯化的样品中含有大量其他囊泡，并不适合后续的特征和应用¹。

解决方案

利用超速离心(UC)的高分辨率纯化能力，可以重复地分离出特定的外泌体亚群。UC是最常用的EVs纯化技术，被广泛认为是金标准⁵⁻⁶。



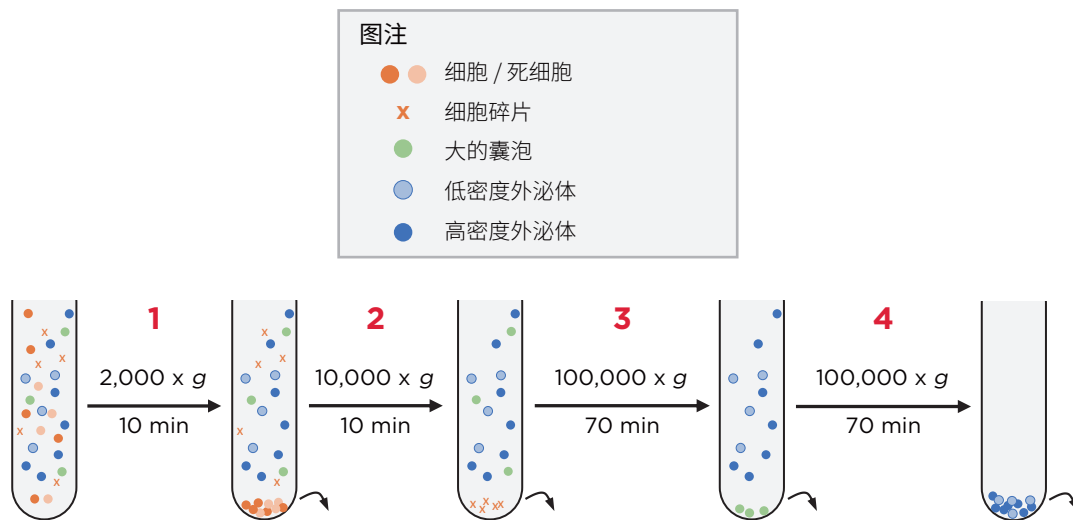
EVs研究中纯化方式的大致比例分布趋势⁶

参考文献:

1. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines.
2. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles.
3. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential.
4. Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells.
5. Methods for extracellular vesicles isolation in a hospital setting.
6. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends.

超速离心外泌体纯化方法与原理

一、差速离心 (Differential ultracentrifugation, DUC)：利用不同颗粒沉降快慢的差异性，逐步增加离心力的大小，进行多次离心依次去除不同大小颗粒的方法。获取外泌体之后还可以进行下一步密度梯度离心纯化。



1. 低速离心清除细胞/死细胞。

注意：离心力大小很大程度上取决于外泌体来源(例如，CHO细胞培养，血液等)。参考文献确定的只是去除特定细胞类型的离心速度。

2. 高速离心去除细胞碎片。

3. 超速离心去除凋亡小体和微囊泡。

4. 超速离心分离外泌体。

注意：在这个阶段，可以考虑多管合一富集外泌体，样品中可能仍含有一些较大的囊泡。

潜在改进措施：

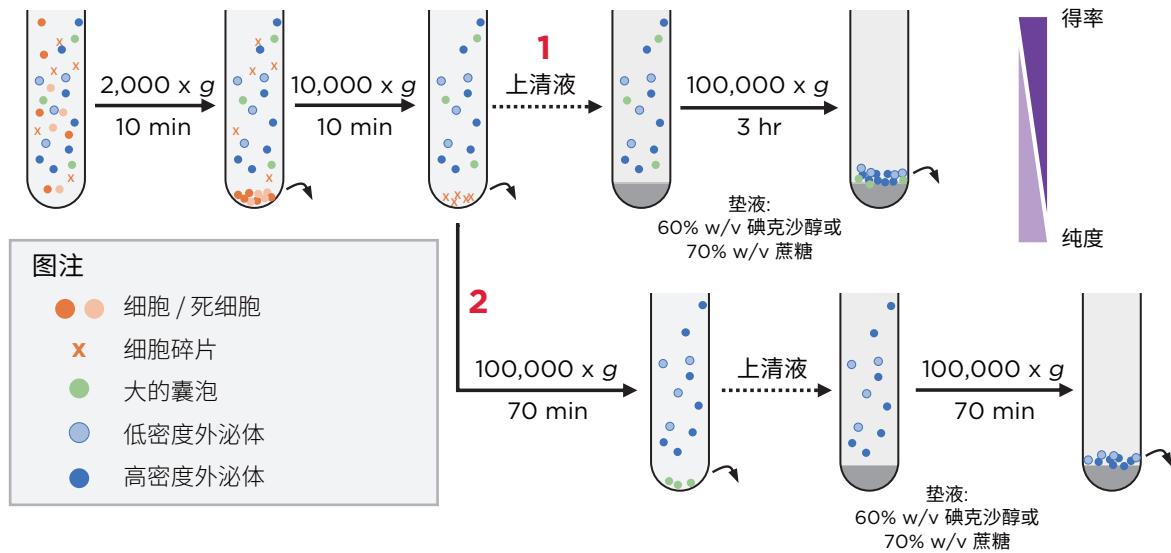
- 更短的离心路径(更低k因子的转子或耗材)
- 锥形管可以提高颗粒的回收率

*本方法可在所有定角和水平转子上运行。

参考文献：

1. Effective Separation of Cancer-Derived Exosomes in Biological Samples for Liquid Biopsy: Classic Strategies and Innovative Development.
2. Optimized method for extraction of exosomes from human primary muscle cells.

二、垫液差速离心 (Cushioned DUC)：在DUC离心过程中，向离心管底添加密度较大的液体溶液形成一层“缓冲层” (如蔗糖或碘克沙醇 [OptiPrep™密度梯度液])。该垫液层可以更温和的进行外泌体颗粒收集，同时更好地保护外泌体的形态、完整性和功能。



垫液DUC与标准DUC的方法和原理几乎相同，外泌体在高密度缓冲层上形成颗粒层，可以更好地保持其形态和功能的完整性。该方法在没有增加操作时间的前提下提高了产品的质量。两种流程可供选择，(1)提供更好的得率(2)提供更高的纯度。

潜在改进措施：

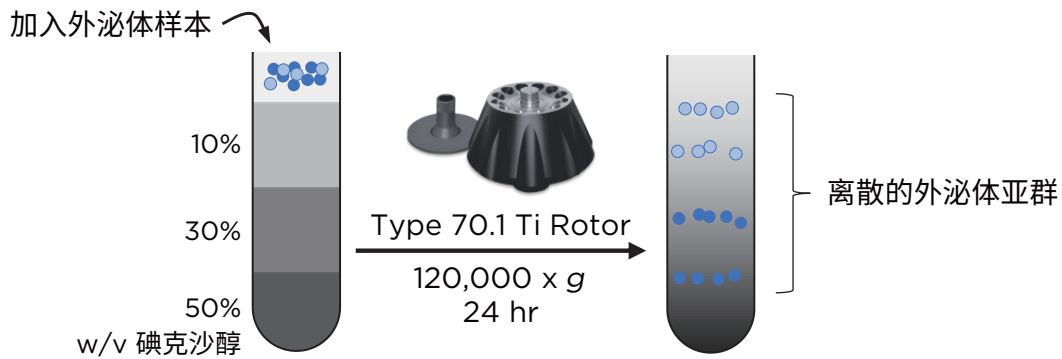
- 更短的离心路径(更低k因子的转子或耗材)

*本方法可在所有定角和水平转子上运行。转子的最大运行速度由样品密度和转子共同决定。使用高密度缓冲层时，请参考转子使用说明书(IFU)，以确定安全运行的最大速度。

参考文献：

1. Cushioned-Density Gradient Ultracentrifugation (C-DGUC) improves the isolation efficiency of extracellular vesicles.
2. Cushioned-Density Gradient Ultracentrifugation (C-DGUC): A Refined and High Performance Method for the Isolation, Characterization, and Use of Exosomes.

三、等密度梯度离心 (Isopycnic DGUC)：在等密度梯度离心中，将梯度液加入到离心管中高速旋转，直到梯度液形成线性(连续)的密度梯度。外泌体会迁移到与它们的浮力密度相同的那一层梯度液。



在等密度梯度离心中，将外泌体样品与碘克沙醇等梯度液一起放入管中。离心管中的梯度液被高速旋转，直到达到平衡，形成线性的密度梯度。有很多可以优化的方面，包括梯度液的层数，每一层梯度液的体积，样品的位置(在层上，层间或层下)，样品的初始密度，运行速度和时间，转子类型等。外泌体的浮力密度通常在1.08和1.20 g/mL之间，但这取决于所使用的密度梯度液。

潜在改进措施：

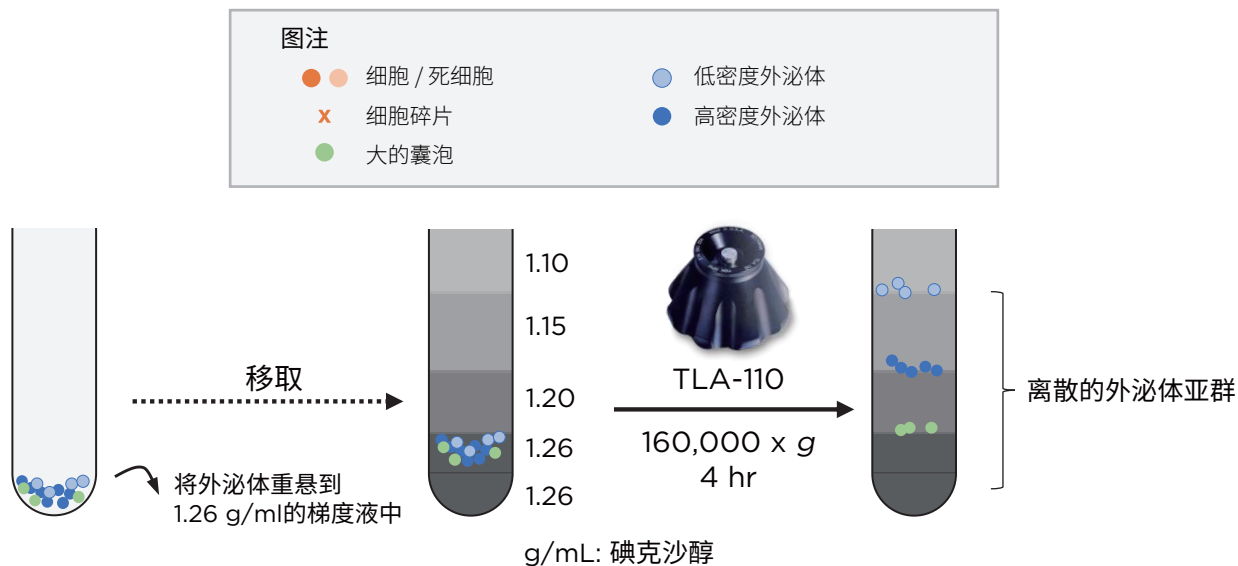
- 使用垂直转子缩短离心半径，以减少运行时间
- 更快的离心转速，以减少运行时间*
- 利用多转速的方法来提高效率（首先使用高转速以快速达到平衡，然后低速以平缓梯度并提升分辨率）
- 使用更多层的起始梯度液，以减少离心时间（会增加前期准备时间，需要权衡总时间）

*转子的最大运行速度由样品密度和转子共同决定。使用高密度缓冲层时，请参考转子使用说明书(IFU)，以确定安全运行的最大速度。

参考文献：

1. Isolation of High-Purity Extracellular Vesicles by the Combination of Iodixanol Density Gradient Ultracentrifugation and Bind-Elute Chromatography From Blood Plasma.
2. Endosomal signalling via exosome surface TGF β -1.
3. Mesenchymal stem cell derived-exosomes: a modern approach in translational medicine.

四、平衡区带密度梯度离心 (Equilibrium zonal DGUC)：平衡区带密度梯度离心与等密度梯度离心相似。但是梯度液不是形成线性梯度，而是维持特定的分层。



平衡区带密度梯度离心中，外泌体样品被放置在装有不同层级梯度液的离心管中。离心后，外泌体将迁移到与其浮力密度相等的梯度液位置，通常在两个梯度液的界面层之间。与等密度梯度非常相似，这种分离方法有许多版本。然而，与等密度梯度相比，实验在线性密度梯度形成之前就停止了（即维持特定的分层）。在这个例子中，外泌体在前处理步骤中先被沉淀，并以特定的密度直接重悬到缓冲溶液中，但这一步不是统一的要求。

潜在改进措施：

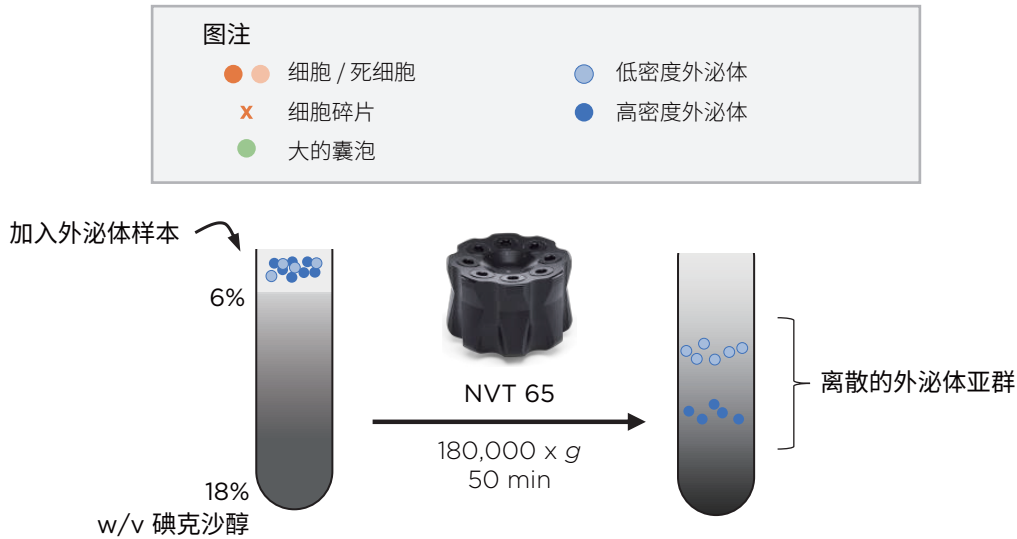
- 使用垂直(或近垂直)转子短离心半径，以减少运行时间*

*转子的最大运行速度由样品密度和转子共同决定。使用高密度缓冲层时，请参考转子使用说明书(IFU)，以确定安全运行的最大速度。

参考文献：

1. Isolation of human salivary extracellular vesicles by iodixanol density gradient ultracentrifugation and their characterizations
2. Isolation of High-Purity Extracellular Vesicles by the Combination of Iodixanol Density Gradient Ultracentrifugation and Bind-Elute Chromatography From Blood Plasma.
3. Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins.

五、速率区带密度梯度离心 (Rate zonal DGUC)：将外泌体样品放置在预先形成的线性密度梯度液（或不连续密度梯度液）的顶部。离心后，外泌体和其他颗粒将以不同的速率沉降，这取决于它们各自的沉降系数。



速率区带密度梯度离心采用初始线性梯度液（或不连续密度梯度液），样品位于顶部。一旦离心开始，外泌体就开始在离心力的作用下以不同的速率向管底沉降，沉降速度取决于它们各自的沉降系数(s值)。一般粒径越大、密越更大的颗粒沉降的越快。

潜在改进措施：

- 使用水平转子来增加离心半径、提高分辨率(但是这会导致更长的运行时间)
- 旋转更快，以减少运行时间*

*转子的最大运行速度由样品密度和转子共同决定。使用高密度缓冲层时，请参考转子使用说明书(IFU)，以确定安全运行的最大速度。

参考文献：

1. Velocity Gradient Separation Reveals a New Extracellular Vesicle Population Enriched in miR-155 and Mitochondrial DNA
2. Are exosomes the vehicle for protein aggregate propagation in neurodegenerative diseases?
3. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics.

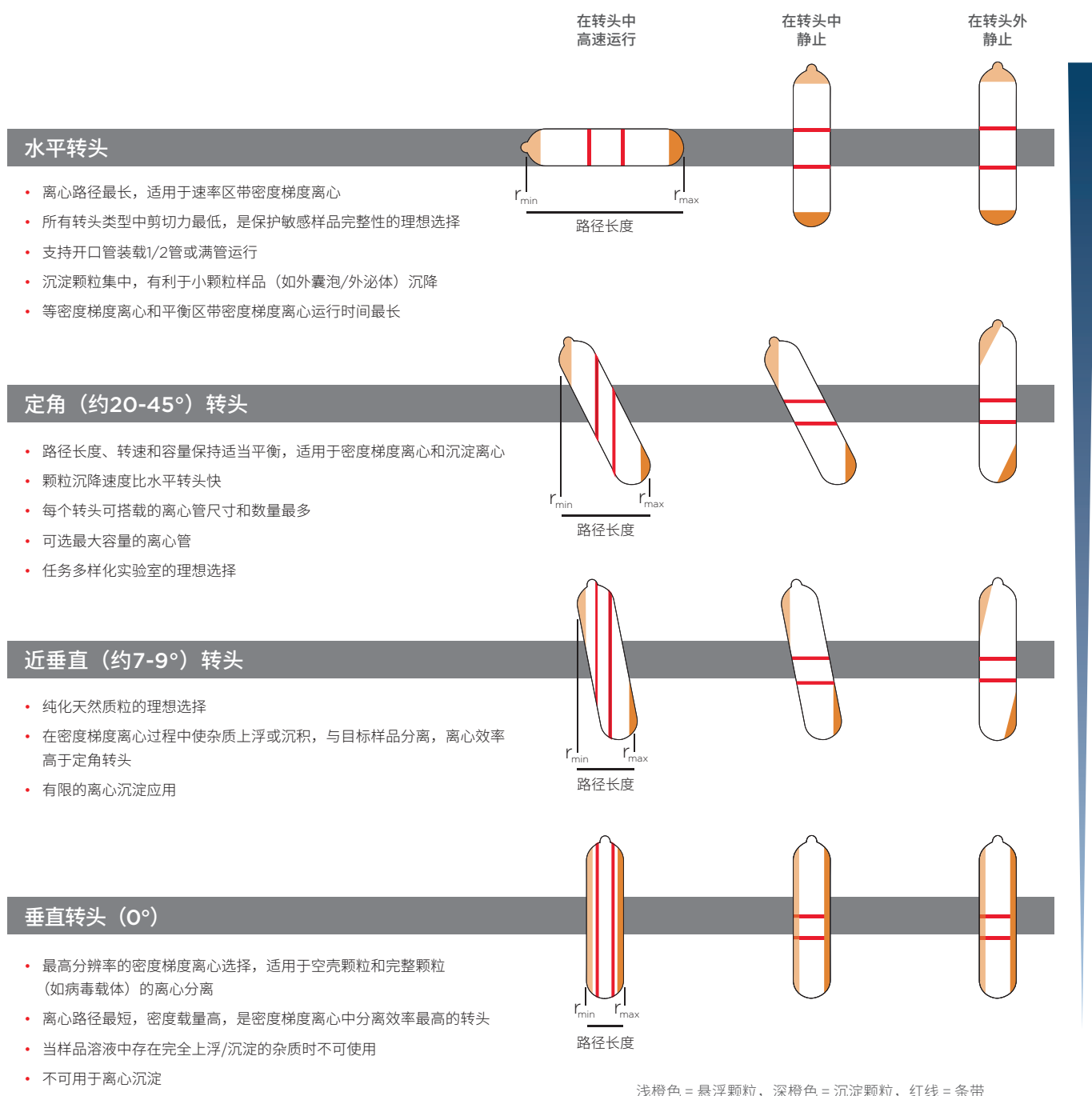
外泌体纯化的超速离心方法比较

	DUC	Cushioned DUC	Isopycnic DGUC	Equilibrium zonal DGUC	Rate zonal DGUC
纯度					
得率					
操作难度					
耗时					
离心原理	大小和质量 (S值)	大小和质量 (S值)	浮力密度	浮力密度	大小和质量 (S值)
推荐转子	FA/SW	FA/SW	VT/NVT	VT/NVT	SW
耗材类型	离心瓶/开口管	离心瓶/开口管	快封管/指封管	快封管/指封管	开口管

该表中的值仅用于进行大致估计，绿色代表优选，橙色代表中选，红色代表未选。

转子推荐指南

采用独特结构设计的各类转头旨在满足不同的离心需求，以提高实验整体效率和通量。因此，无论通过沉淀、差速还是密度梯度法进行离心分离，根据具体应用选择最佳转头类型至关重要。



耗材推荐指南

大多数离心管有多种材料制成，聚丙烯（PP）可以高温高压灭菌，同时更容易穿刺取样，聚碳酸酯（PC）和Ultra-Clear（UC）透明度更高。

离心瓶



容量 (mL)	适用转头
70	Type 45 Ti
26.3	Type 70 Ti, Type 50.2 Ti
10.4	Type 90 Ti, Type 70.1 Ti, MLA-55

常见离心瓶与转子搭配

- 材质和类型：聚碳酸酯 (PC) 和聚丙烯 (PP)
- 容量范围：8.5mL - 250mL
- 三件式密封帽组件，实现防漏封闭
- 可回收利用，支持较大体积的样品离心
- 离心体积灵活

开口管



容量 (mL)	适用转头
70	Type 45 Ti
26.3	Type 70 Ti, Type 50.2 Ti
10.4	Type 90 Ti, Type 70.1 Ti, MLA-55

常见开口管与转子搭配

薄壁开口管

- 材质和类型：聚丙烯 (PP) 和超净 (UC)
- 容量范围：175 μ L - 94mL
- 管底形状：圆底和锥底
- 专为一次性使用所设计
- 提供大开口，便于上样和样品回收利用
- 定角转头需要配备管帽密封组件

厚壁开口管

- 材质和类型：聚碳酸酯 (PC) 和聚丙烯 (PP)
- 容量范围：230 μ L - 94mL
- 可重复使用
- 提供大敞口，以便上样和样品回收利用

快封管



容量 (mL)	适用转头
100	Type 45 Ti
39	Type 70 Ti, Type 50.2 Ti, VTi 50.1
13.5	Type 90 Ti, Type 70.1 Ti, NVT 65, VTi 65.1, MLA-55

常见快封管与转子搭配

- 材质和类型：薄壁聚丙烯 (PP) 和超净 (UC)
- 容量范围：1mL - 100mL
- 类型：圆底和锥底
- 可切片或穿刺
- 手持式热封器和配件，用于密封快封管
- 离心期间，应在快封管上部放置适配器（浮动管帽或垫片）

指封管



容量 (mL)	适用转头
32.4	Type 70 Ti, Type 50.2 Ti, SW 32 Ti, SW 28, MLA-50
8.9	Type 90 Ti, Type 70.1 Ti, MLA-55
4.9	VTi 90, VTi 65.2, NVT 90, NVT 65.2
4.7	Type 50.4 Ti, TLA-110

常见指封管与转子搭配

- 材质和类型：薄壁聚丙烯 (PP)
- 容量范围：3.3mL - 36.2mL
- 可切片或穿刺取样
- 管颈较宽，更易于缓冲液和样品上样
- 采用带 O 型圈的 Noryl（聚苯醚）管塞密封指封管
- 离心期间，应在指封管上部放置适配器（管帽）

主机推荐指南

超速离心机

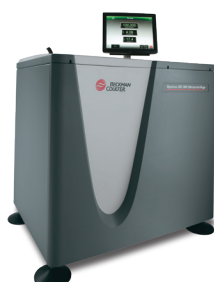
作为超速离心机领域领先品牌，Optima X系列堪称贝克曼离心机当之无愧的经典。该系列产品从离心管、转头到离心机主体的所有部件均采用整体化的设计理念，贝克曼全情投入多年设计经验，全力打造易于使用、安全可靠的让用户满意的产品。

体积更大，转子种类更多，功能更全面

专业版



基础款



Optima XPN-100/90/80

最大转速：100,000/90,000/80,000 rpm

最大相对离心力：
802,000/694,000/548,300 x g

最大容量：6×250 mL

重量：485 kg

软件：eXpert离心专家软件，三级用户管理，
远程监控，历史记录与导出，电子签名，符合
21 CFR part 11

Optima XE-100/90

最大转速：100,000/90,000 rpm

最大相对离心力：802,000/694,000 x g

最大容量：6×250 mL

重量：485 kg

体积更小巧，适合小体积样品快速离心

专业版



基础款



Optima MAX-XP

最大转速：150,000 rpm

最大相对离心力：1,019,000 x g

最大容量：6×32.4 mL

重量：105 kg

软件：用户管理，历史记录与导出

Optima MAX-TL

最大转速：120,000 rpm

最大相对离心力：657,000 x g

最大容量：8×5.1 mL

重量：105 kg

落地式超速离心机

台式超速离心机

高速离心机

作为一款智能型高效离心机，Avanti J®系列以贝克曼库尔特的先进技术为强劲支撑，该系列备受研究人员推崇，广泛应用于各类实验。因此，选择贝克曼库尔特离心机可最大限度重现与参考文献相同的实验条件，减少预处理条件的检查时间。



Avanti JXN-30

最大转速：30,000 rpm

最大相对离心力：110,500 x g

最大容量：4×1,000 mL

软件：符合21 CFR part 11，三级用户管理，
远程监控，历史记录与导出，电子签名



JA-30.50 Ti
108,860 x g
8 x 50 mL



JS-24.15
1110,500 x g
6 x 15 mL



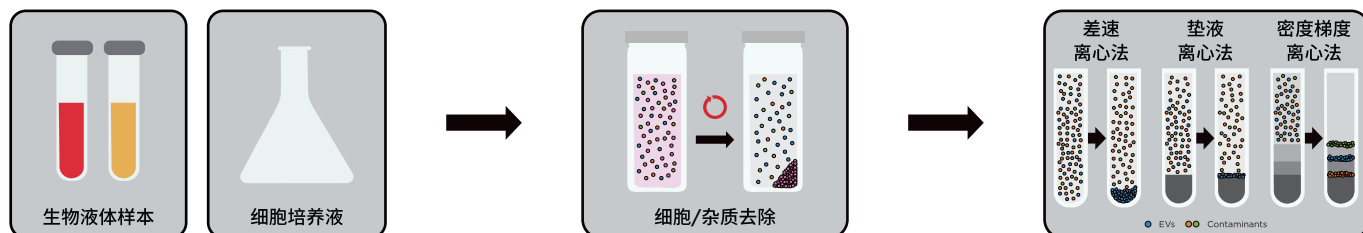
JS-24.38
103,900 x g
6 x 38.5 mL

作为高性能离心机JXN系列的一员，Avanti JXN-30通过搭配JA-30.50 Ti定角转子、JS-24.15水平转子和JS-24.38水平转子，即可达到纯化外泌体所需的大于100,000 x g的超速离心力，进行外泌体分离和纯化¹⁻⁴。

参考文献：

1. Nidogen 1-Enriched Extracellular Vesicles Facilitate Extrahepatic Metastasis of Liver Cancer by Activating Pulmonary Fibroblasts to Secrete Tumor Necrosis Factor Receptor 1.
2. MALDI-MS-based biomarker analysis of extracellular vesicles from human lung carcinoma cells.
3. Preservation of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles after Abdominal Delivery in the Experiment.
4. Tumour extracellular vesicle-derived Complement Factor H promotes tumorigenesis and metastasis by inhibiting complement-dependent cytotoxicity of tumour cells.

外泌体离心整体解决方案



小规模



Avanti J-15 Series

最大离心力: 11,419 x g; 最大体积: 6 x 100 mL



JA-10.100



Optima Max-XP

定角转子最大离心力: 287,000 x g; 最大体积: 8 x 13.5 mL
水平转子最大离心力: 268,000 x g; 最大体积: 4 x 5 mL



MLA-55



MLS-50

大规模



Avanti JXN-26

最大离心力: 11,419 x g; 最大体积: 6 x 500 mL



JA-10.500



Optima XPN

定角转子最大离心力: 302,000 x g; 最大体积: 12 x 39 mL
水平转子最大离心力: 288,000 x g; 最大体积: 6 x 13.2 mL



Type 50.2 Ti



SW 41 Ti

最大规模



Avanti JXN-26

最大离心力: 15,970 x g; 最大体积: 6 x 1000 mL



JLA-8.1000



Optima XPN

定角转子最大离心力: 235,000 x g; 最大体积: 6 x 94 mL
水平转子最大离心力: 175,000 x g; 最大体积: 6 x 38.5 mL



Type 45 Ti



SW 32 Ti

- * 以上产品仅用于工业及科研，不用于临床诊断，禁忌内容或注意事项详见说明书。
- * 未经授权，不得对原有的文字图片等内容进行变动、重新编排或者增加新的内容，贝克曼库尔特保留在不告知前提下随时更新版本的权利。
- * 商标中Life Sciences为整体商标的一部分，意为“生命科学”。



贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司

贝克曼库尔特生命科学热线:400 821 8935
联系邮箱:apls@beckman.com
官网:mybeckman.cn

@2024 Beckman Coulter International Trading (Shanghai) Co., Ltd.

