



NeoraBio

外泌体取样参考



目录

1.样本准备通用建议	1
2.外泌体送样建议	2
3.动物类样本取样建议	3
组织样本	3
细胞样本	4
血液样本	4
其他样本	5
3. 植物类样本取样建议	5
4.声明	6



1.样本准备通用建议

1. 取样代表性与一致性	样本的取材部位、时间、处理过程等方面尽可能保持一致，否则可能会影响实验结果的可信度及组内重复情况。 准确分离病变组织和对照组织，取样部位不一致和不具有代表性同样可能影响结果的准确性。
2. 取样及保存环境	样本质量是影响实验结果的最主要因素，用于研究的样本，在采集、制备、贮存、运输过程中应尽可能地快，最大限度的缩短从样本采集到实验的时间。 样本离体后，立即在 4℃或冰上等低温条件下进行分离，分离好的样品立即置于液氮、干冰或-80℃冰箱中直至寄送，以避免物质的降解。
3. 样品名称	最好采用双重标记以防样品名称模糊；建议使用进口离心管。 标记 1：用高质量的油性笔在样品管上写上清晰、简单的样品名称，最好 5 个字符以内（不要写中文），用封口膜封好， 标记 2：将样品名称等信息写在标签纸上，贴在管壁上，最好用胶带粘贴牢固以防低温条件下样品标签脱落。
4. 样品包装	按送样建议准备样品，采用高质量离心管盛装样品。冷冻的组织，用高质量的 2 mL 螺旋冻存管装载；离心管应用封口膜密封管口。 干冰运输，干冰参考量=（运输天数+1）*5kg。 如个别样本需 4° C 或常温保存，请将保存条件纸条附于包裹内。
5. 邮寄样品	邮寄样品请附带完整的样品信息说明。建议自己存好备份样品。如样品有生物危险请提前咨询技术人员。 对于需要同时做多种检测的样本，请提前确认各类下游实验的样本保存方式，并分开收集样本，避免分装过程中的反复冻融。

注：液氮速冻及干冰运输时，过大的样本体积容易造成离心管炸裂，建议将样本量控制在离心管最大容积的 **80%**内。



2.外泌体送样建议

样品建议送样量						
项目类型	透射电镜	粒径及浓度	流式检测 (1 个指标)	WB 检测 (1 个指标)	建议送样量	备注
外泌体	15ul	15ul	15ul	15ul	100ul	默认外泌体浓度 $>10^9$ 个/mL，根据后续实验及样本质量对样本总量要求会有差别，部分实验（如qRT 验证 10ng 总 RNA；NGS 测序 20ng 总 RNA；蛋白质谱 30ug 总蛋白等）建议适当加大送样量
血清/血浆	0.5mL	0.5mL	0.5mL	1mL	5ml	
细胞上清	10mL	10mL	10mL	20mL	100ml	
尿液	10mL	10mL	10mL	20mL	100ml	
唾液	2ml	2ml	2ml	4ml	15ml	
鼻涕	2ml	2ml	2ml	4ml	15ml	
脑脊液	2ml	2ml	2ml	4ml	15ml	
羊水	5mL	5mL	5mL	10mL	50ml	
精液	0.5mL	0.5mL	1mL	1mL	5ml	
胆汁	0.5mL	0.5mL	1mL	1mL	5ml	
腹水	5mL	5mL	5mL	10mL	50ml	
乳液	2ml	2ml	2ml	4ml	15ml	
卵泡液	2mL	2mL	4mL	8mL	15ml	
粪便上清	5mL	5mL	5mL	10mL	50ml	
菌液上清	10mL	10mL	10mL	20mL	100ml	
动物组织	0.3g	/	/	/	/	
植物样本	0.5g	/	/	/	/	



3.动物类样本取样建议

组织样本	
动物组织采集	1. 术前消毒：手术前使用碘伏严格消毒手术器械，铺好无菌巾。 2. 组织获取：切除的组织标本迅速用抗生素冲洗，然后放置于无菌的含有无血清 DMEM 细胞培养液 的 50ml 离心管中，盖上盖子。 3. 转移：将上述 50ml 离心管放入冰盒中，立即带至实验室。 4. 清洗：在生物安全柜中去除离心管内的 DMEM 细胞培养液，使用含抗生素的 PBS 反复冲洗，去除组织内的血凝块。 5. 保存：将上述组织放置到含 2% FBS 的 DMEM 的管子中。 6. 补液：用相应的补充液将装有组织块的管子内液体补满，拧紧盖子，上下颠倒没有明显气泡即可。 7. 封口：用封口膜将管子缠绕 2-3 圈。 8. 寄送：冰袋 4℃寄送，48 小时内送到实验室进行后续处理。
动物组织体外培养	1. 收到组织样本后，组织样本寄送液进行培养，检测组织是否有污染。 2. 组织样本用 RPMI 1640 清洗一次，用手术剪建成 1mm³ 的组织小块； 3. 切碎的组织小块过 70 目的细胞筛网，去除组织碎片； 4. 将组织块放入 6 孔板的 traswell 小室中，加入 RPMI 1640，10%FBS(无外泌体)培养基； 5. 1ml 的上清液加入 50mg 的组织，培养 48 或者 72h,然后收集培养液； 6. 4℃，2000g 离心 10min,收集上清； 7. 4℃，10000g 离心 30min,收集上清。 8. 上清用于外泌体分离。
动物组织酶解	1. 收到组织样本后，组织样本寄送液进行培养，检测组织是否有污染。 2. 弃去上清，加入 2.4 U/mL 的 Dispase II，4℃消化过夜。 3. 吸去 Dispase II，PBS 冲洗两遍，将组织样本转移至含 PBS 的 10 cm 细胞培养皿中。 4. 用眼科剪刀将组织样本剪成约 1 mm³ 大小的组织碎片，置于 50 mL 离心管中。 5. 在上述离心管中加入 5 倍体积的 0.2% I 型胶原酶溶液，放入恒温培养箱中，37℃轻微震荡消化 1.5 h 至细胞悬液呈乳浊状。 6. 轻轻吹打至单细胞悬液，加入 PBS 至合适体积。 7. 4℃，2000g 离心 10min,收集上清； 8. 4℃，10000g 离心 30min,收集上清。 9. 上清用于外泌体分离。



细胞样本

细胞上清 (需采用去除外泌体的培养基)	1. 细胞在正常含有血清的培养基中培养一定时间, 贴壁细胞密度在 70 %-80 %, 悬浮细胞密度在 60 %-70 %; 2. 对于贴壁细胞, 去除原有培养基, 换为新的不含外泌体的培养基或者无血清培养基; 对于悬浮细胞, 300 g, 4℃, 10 min 收集细胞; 3. 使用不含外泌体的培养基或者无血清培养基悬浮细胞并继续培养。细胞继续培养 24-48 小时, 根据细胞的生长速度确定收取上清时间; 4. 收集细胞上清, 300 g, 4℃, 离心 10 min; 小心吸取上清, 注意避免吸入细胞或者细胞碎片; 5. 3000 g, 4℃, 再次离心 15 min, 确保将细胞或者细胞碎片去除干净; 6. 取上清, 注意避免吸入细胞或者细胞碎片, 合并相同的细胞培养液上清样品, 装入无菌的玻璃瓶, 可在 4℃短期保存 (1-2 天), 长期保存可冻存于-80℃。 7. 干冰寄送 注意事项 1. 建议细胞上清分离后尽快进行外泌体分离, 保存在 4℃和-80℃, 都会对产量有一定的影响。 2. 如果提供的是冻存细胞株, 需提供详尽的复苏方法。 3. 细胞培养基必须使用去除 exosome (de-exosome) 的血清或者无血清培养基 (例如 Thermo Fisher 的 SFM)。
------------------------	--

血液样本

血浆样品 (不能用肝素抗凝)	1. 用采血针和 EDTA 抗凝管抽取全血, 轻柔上下颠倒混匀后室温或者 4° C 保存, 并在 1 小时内进行下一步处理; 2. 4° C 条件下, 使用吊桶式转头 1900 g 离心 10 min, 小心吸取上清即为血浆, 最后 500 μl 左右丢弃。得到的血浆再次离心, 条件为 4° C, 3000 g, 15 min, 小心吸出血浆, 注意不要碰到底部和侧面的沉淀物; 3. 将血浆冻存于-80° C; 干冰寄送, 送样量最好 4 ml 以上 (分离 4 ml 血浆约需要 8-10 ml 全血)。
血清样品 (有条件的话尽量采用血浆, 避免血小板来源的外泌体影响)	1. 用采血针和普通血清管 (不含任何试剂, 10ml 规格) 采血 10 ml; 室温静置 30 min, 然后 4° C 条件下, 静置 3-4 小时 (此时可见血块析出); 2. 用移液器吸取上面的淡黄色血清 (应该有 4 ml 左右) 转入 15 ml 离心管中, 4° C 条件下 3000g 离心 15min, 小心取上清转入新的 15 ml 离心管中, 最大程度保证血清质量; 3. 离心后的血清 15 分钟内冻存于-80° C 冰箱; 干冰寄送。 提示: 送样量最好 4 ml 以上 (分离 4 ml 血清约需要 10-15ml 全血)
	注意事项 全血建议使用 PAXgene 管保存, 不可冻融, 取血后尽早制备血浆或血清, 血浆或血清可以-80° C 保存, 但应避免反复冻融。



其他样本	
尿液	1. 采集前/中后段晨尿，应该尽量选择受试者的“新鲜”尿液 100ml，并注意避免细菌污染，收集前注意对饮食的控制，于 4℃ 临时保存（不得超过 8 h） 2. 并于 3000×g 离心 15min，去除细胞或细胞碎片； 3. -80℃冰箱中保存，干冰寄送
脑脊液	1. 收集脑脊液 10ml，采集方式为腰椎穿刺，样本一经分离，请务必立即置于冰上或 4℃ 短暂保存（不得超过 4 h），避免受到血液污染，勿使用含肝素抗凝剂的采样管收集盛放； 2. 并于 3000×g 离心 15min，去除细胞或细胞碎片； 4. -80℃冰箱中保存，干冰寄送
胸水	1. 临床收集胸水后若不能第一时间处理，请于 4℃ 临时保存（不得超过 8 h）； 2. 将收集到的胸水 1000 g 离心 10 min，收集上清液； 3. 将得到的胸水上清 3000 g 离心 10 min，收集上清； 4. -80℃冰箱中保存，干冰寄送
腹水	1. 临床收集腹水后若不能第一时间处理，请于 4℃ 临时保存（不得超过 8 h）； 2. 将采集到的腹水在 4℃ 下（室温亦可）离心 2000 g，20 min，去除腹水中的残渣； 5. -80℃冰箱中保存，干冰寄送
胆汁	1. 用无菌容器收集胆汁； 2. 将收集到的胆汁在 4℃ 下，3000 g 离心 10 min 去除细胞残渣和碎片；收集胆汁上清液，4℃ 或者 -20℃ 长期保存。

3. 植物类样本取样建议

植物组织	
植物组织酶解	1. 将样本用手术刀切取 5g 分出，用蒸馏水洗干净，用滤纸吸干表面水分。 2. 所有取样器械经过高温高压灭菌后，在超净台中进行，将样本切碎，浸泡在 75% 酒精中 1 分钟，之后再用蒸馏水洗去酒精残留后，用无菌纸擦干，加入酶液 20 mL（4% 纤维素酶，2% 果胶酶，0.6 mol/L 甘露醇，pH5.8），50℃ 酶解 6 h。 3. 样本以 10000 rpm 离心 1 h，使酶解的组织渣质沉降，上清液过细胞筛，收取滤液。 4. 取滤液用 300 KD 透析袋透析过夜，透析液为 1×PBS。
植物组织榨汁	1. 将样本用蒸馏水洗干净。 2. 用滤纸吸干表面水分，在超净台中进行，75% 酒精消毒 1 分钟。 3. 去皮后榨汁器榨汁（汁液较少的话可加适量 PBS 稀释）。 4. 将样本移动至一个新的离心管内，低速离心取上清保存。



4.声明

我司拒绝接收《人间传染的病原微生物名录》中危害程度为第一、第二类的高致病组织、血液、细菌等样品，只接收提取得到的核酸样品。危害程度为第三、第四类的致病性或传染性的组织、血液、细菌等样品，必须事先通过销售、客服或运营经理与技术支持人员联系，确定无高致病性和传染性后才能寄送样品。

样品寄送时应采用 WHO 提出的三包装系统，第一层容器：装样品，要求防渗漏；第二层要求耐受性好、防渗漏，容纳并保护第一层容器；第三层容器：放在一个运输用外层包装内。在第二层包装注明“致病性样品，接收时请注意”字样，并在样品信息单上注明其危害程度及接收注意事项。此类样品寄送时销售或运营经理务必邮件通知样品组，告知样品组相关寄送信息（快递单号、样品类型、样品数量）以及接收时的防护措施和注意事项。

感谢您选择我们！

我们期待与您携手并进，共创科研新高度。

我们将以严谨、专业的态度对待每一个样本，为您的科研探索保驾护航。