(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119432717 A
(43)申请公布日 2025.02.14

(21)申请号 202510024984.5

(22)申请日 2025.01.08

(71)申请人 北京三元食品股份有限公司
地址 100163 北京市大兴区瀛海瀛昌街8号

(72)发明人 陈历俊 邸淑娟 乔为仓 王亚玲 付婕妤 张宇 刘彦品 赵军英

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
专利代理师 盛大文

(51)Int.Cl.
C12N 5/071(2010.01)
A61K 35/20(2006.01)
A23L 33/10(2016.01)

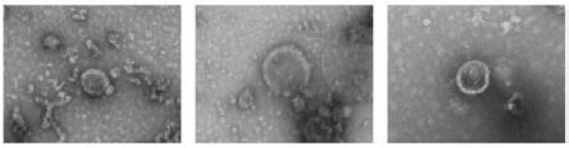
权利要求书1页 说明书9页 附图6页

(54)发明名称

一种母乳源外泌体及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供一种母乳源外泌体及其制备方法和应用。所述母乳源外泌体的制备方法包括:对母乳进行前处理,然后将前处理后的母乳进行母乳源外泌体的初纯浓缩和精纯;其中,所述前处理包括将脱脂母乳与磷酸钠溶液混合的步骤;所述初纯浓缩包括采用切向流超滤处理;所述精纯包括采用多模式色谱法纯化处理。本发明提供了一种母乳外泌体的规模化纯化工艺,能处理大量样本,提高了母乳外泌体的纯度和产率,并保证了母乳外泌体的形态完整性。



对比例1 对比例2 实施例1

CN 119432717 A

1.一种母乳源外泌体的制备方法,其特征在于,包括:对母乳进行前处理,然后将前处理后的母乳进行母乳源外泌体的初纯浓缩和精纯;其中,所述前处理包括将脱脂母乳与磷酸钠溶液混合的步骤;所述初纯浓缩包括采用切向流超滤处理;所述精纯包括采用多模式色谱法纯化处理。

2.根据权利要求1所述的母乳源外泌体的制备方法,其特征在于,所述磷酸钠溶液的浓度为0.5-2.0M,所述磷酸钠溶液的pH为5.3-8.0。

3.根据权利要求2所述的母乳源外泌体的制备方法,其特征在于,所述磷酸钠溶液的浓度为0.5-1.5M,所述磷酸钠溶液的pH为5.8-6.8。

4.根据权利要求3所述的母乳源外泌体的制备方法,其特征在于,所述前处理包括:将母乳进行脱脂,得到脱脂母乳;将所述脱脂母乳与磷酸钠溶液以体积比1-2:1-2进行混合,并在3-5℃下沉淀蛋白,离心后进行滤膜过滤。

5.根据权利要求1-4任一项所述的母乳源外泌体的制备方法,其特征在于,所述切向流超滤采用PES超滤膜包,所述PES超滤膜包为300kDa超滤膜包;和/或,所述切向流超滤中,循环多次过膜至样品体积浓缩为样品原体积的1/9-1/10。

6.根据权利要求5所述的母乳源外泌体的制备方法,其特征在于,所述多模式色谱法纯化处理采用HiScreen capto core 700多模式色谱柱。

7.根据权利要求6所述的母乳源外泌体的制备方法,其特征在于,所述多模式色谱法纯化处理中,进样流速为2.0-2.5mL/min,柱压为0.7-0.8MPa,填料压力为0.2-0.3MPa,收集温度为3-6℃。

8.根据权利要求1所述的母乳源外泌体的制备方法,其特征在于,还包括在所述精纯后进行浓缩的步骤,所述浓缩采用50kDa超滤管。

9.权利要求1-8任一项所述的母乳源外泌体的制备方法得到的母乳源外泌体。

10.权利要求1-8任一项所述的母乳源外泌体的制备方法得到的母乳源外泌体在制备婴幼儿配方食品或药物中的应用。

一种母乳源外泌体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及外泌体制备技术领域,尤其涉及一种母乳源外泌体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 外泌体已被证明在各种生命活动中发挥重要作用,例如抗原传递、炎症以及细胞稳态和凋亡等方面,这些作用主要是依赖于外泌体能够转移RNA,蛋白质和脂质的能力。母乳是一种丰富的外泌体来源,相较于其他来源外泌体而言具有更优异的生物相容性,同时凭借母乳源外泌体的疏水及亲水特性,使其在消化道表现出异常的稳定性。因此,母乳源外泌体在婴幼儿配方食品开发、临床医学的应用等方面占据重要地位。

[0003] 作为母乳外泌体的研究的第一步,其制备方法至关重要。由于母乳中存在高峰度的乳蛋白,并以多种聚集状态(游离蛋白分子与可溶性胶体或胶束)存在。因此,从母乳中制备外泌体比由细胞上清液中制备外泌体更具挑战。母乳源外泌体现有的制备方法主要有超速离心法、超滤离心法、密度梯度离心法和尺寸排阻色谱法等,其中超速离心法是外泌体制备金标准,它是通过多轮超高转速的离心达到制备外泌体的效果。但其存在前处理乳蛋白去除不彻底,外泌体纯度低,形态完整性被破坏和样品处理规模与产率受限等缺点。因此,深入探讨母乳外泌体的规模化制备方法尤为重要,可为后续母乳外泌体的组成及功能研究及实际生产应用奠定基础,目前,针对母乳源外泌体规模化制备方法的报道未见。

发明内容

[0004] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种母乳源外泌体及其制备方法和应用。本发明通过结合前处理/切向流超滤和多模式色谱法,成功建立了母乳外泌体的规模化纯化工艺,显著提高了外泌体的纯度和产率。该方法避免了超速离心带来的机械损伤,保证了母乳外泌体的形态完整性,同时能够处理大量样本,适用于功能验证实验、临床应用及实际生产。

[0005] 本发明建立一种能够实现规模化生产的母乳外泌体纯化工艺,用于实验室和工业规模生产,并评价母乳源外泌体的分子生物学活性。以外泌体制备的“金标准”-超速离心法(UC)做对照,采用不同化学前处理方法去除乳蛋白,通过切向流超滤(TFF)的方法对经过前处理后得到的乳清进行初步的纯化与浓缩,多模式色谱法(BE-SEC)精纯母乳外泌体并收集,采用透射电子显微镜(TEM)观察母乳外泌体的形态,纳米流式细胞术(NanoFCM)检测母乳外泌体的粒径、颗粒浓度和纯度,高效液相色谱法(HPLC)验证母乳外泌体的尺寸和纯度,蛋白免疫印迹法(WB)检测母乳外泌体标志性蛋白的特异性表达。该工艺方法所得母乳外泌体纯度、产率均优于UC所得样品,样品理化性质符合典型母乳外泌体标准。本发明方法能够规模化制备高纯度母乳源外泌体,并有利于更好解决现有传统母乳源外泌体制备方法存在的前处理乳蛋白去除不彻底,外泌体纯度低,形态完整性被破坏和样品处理规模与产率受限等缺点,为日后功能验证实验(细胞试验和动物实验)、临床应用及实际生产应用等方面

提供产量支持。

[0006] 具体而言,第一方面,本发明提供一种母乳源外泌体的制备方法,包括:对母乳进行前处理,然后将前处理后的母乳进行母乳源外泌体的初纯浓缩和精纯;其中,所述前处理包括将脱脂母乳与磷酸钠溶液混合的步骤;所述初纯浓缩包括采用切向流超滤处理;所述精纯包括采用多模式色谱法纯化处理。本发明中,采用切向流超滤和多模式色谱法相结合的方法制备母乳源外泌体,可以替换超速离心法中的超高转速的离心过程,这样在保证制备规模和产量的同时,又可以确保母乳源外泌体免受超高速离心过程带来的机械损伤,从而确保其生物学形态完整:切向流超滤能快捷高效地进行生物分子的分离与纯化处理,可用于低至10mL、高达数千升样品溶液的浓缩和脱盐处理,其原理是样品液体中物质分子量小于超滤膜包孔径的可以透过膜包称为透过液,相反,分子量大于超滤膜包孔径的物质(母乳源外泌体)可以被膜包截留,称为截留液,外泌体样品通过多次循环过膜的步骤可以起到一个初纯和浓缩的效果。经过切向流超滤浓缩后的样品溶液,利用多模式色谱柱进行进一步精纯,从而收集纯化后的母乳源外泌体。惰性外壳不允许大分子通过外壳的孔进入核内。在层析柱流穿过程中收集这些较大分子(例如母乳外泌体),而较小杂质与内化配基结合。本发明采用磷酸钠试剂作为前处理试剂并通过盐析法沉淀蛋白质能更好的去除母乳中的绝大多数酪蛋白,并利于后续处理,与超速离心法直接离心去除乳蛋白相比,该方法更利于扩大母乳外泌体的制备规模,且有利于提升母乳源外泌体的纯度和保证其生物学形态的完整性。

[0007] 作为优选,所述磷酸钠溶液的浓度为0.5-2.0M,所述磷酸钠溶液的pH为5.3-8.0。本发明中,采用一定浓度和pH的磷酸钠试剂作为前处理试剂,通过盐析法沉淀蛋白质去除母乳中的绝大多数酪蛋白,这与超速离心法直接离心等方式去除乳蛋白相比,该方法更利于扩大母乳外泌体的制备规模,且有利于提升母乳源外泌体的纯度和保证其生物学形态的完整性,尤其是采用优选浓度的磷酸钠试剂效果更佳。

[0008] 进一步优选,所述磷酸钠溶液的浓度为0.5-1.5M,优选为1±0.2M,所述磷酸钠溶液的pH为5.8-6.8,优选为6.3±0.2。采用磷酸钠试剂(1M,pH6.3)效果最佳。

[0009] 作为优选,所述前处理包括:将母乳进行脱脂,得到脱脂母乳;将所述脱脂母乳与磷酸钠溶液以体积比1-2:1-2进行混合,并在3-5℃下沉淀蛋白,离心后进行滤膜过滤;所述滤膜过滤优选包括0.22μm滤膜过滤。

[0010] 进一步优选,所述脱脂母乳与所述磷酸钠溶液为等体积混合;和/或,所述离心去沉淀包括在9000-12000r/min转速和3-5℃温度下离心15-20min;将离心后的上清进行包括0.22μm滤膜过滤的处理,优选依次通过0.8μm、0.45μm和0.22μm滤膜过滤。

[0011] 本发明中,所述母乳为哺乳动物的乳汁,包括但不限于牛乳、人乳等。

[0012] 作为优选,所述切向流超滤处理采用PES超滤膜包,所述PES超滤膜包优选为300kDa超滤膜包,更优选为300kDa超滤膜包(P2B300C01,0.1m^2)。本发明通过采用PES超滤膜包的切向流超滤,尤其是分子量300kDa的超滤膜包(如P2B300C01,0.1m^2)进行处理,能够更好地将母乳上清液中的杂质蛋白透过滤出,保留含有母乳源外泌体的样品液体,使得TFF得到的粗纯样品中的杂质相对更少以及浓缩效果更佳。

[0013] 作为优选,所述切向流超滤中,循环多次过膜至样品体积浓缩为样品原体积的1/9-1/10。

[0014] 作为优选,所述多模式色谱法纯化处理采用HiScreen capto core 700多模式色谱柱。本发明中,经过切向流超滤浓缩后的样品溶液,利用多模式色谱柱(HiScreen capto core 700)进行进一步精纯,能够更好地收集纯化后的母乳源外泌体。HiScreen capto core 700 由配基活化核心和惰性外壳组成,惰性外壳不允许大分子(临界值约为700 kDa)通过外壳的孔进入核内,在层析柱流穿过程中收集这些母乳外泌体,而较小杂质与内化配基结合,本发明发型采用优选的HiScreen capto core 700多模式色谱柱效果最佳。

[0015] 优选的,所述多模式色谱法纯化处理中,进样流速为2.0-2.5mL/min,柱压为0.7-0.8MPa,填料压力为0.2-0.3MPa,收集温度为3-6℃。采用优化色谱柱及多模式色谱条件,有利于多模式色谱柱在条件允许的前提下更好的吸附杂质,收集母乳源外泌体,尤其是去除与母乳源外泌体分子量相接近的杂质,能够取得更佳的纯化效果以及保持母乳源外泌体最佳的生物学活性。

[0016] 进一步优选,所述多模式色谱法纯化处理中还包括:超纯水对系统进行泵洗,任选的进行手动排气泡,使用超纯水冲洗2-4个柱体积,然后使用1×PBS缓冲液平衡2-4个柱体积。

[0017] 进一步优选,还包括在所述精纯后进行浓缩的步骤,所述浓缩采用50kDa超滤管。本发明中,采用超滤管浓缩母乳源外泌体,经切向流超滤和多模式色谱法纯化后的母乳源外泌体,纯度得到提升,优选采用50kDa超滤管对其进行浓缩使其浓度得到进一步提升,浓缩后浓度较浓缩前可提升大致30倍。进一步优选,所述浓缩采用50mL,50kDa超滤管于6000×g,20℃的条件下离心15min,得到浓缩的母乳源外泌体,低温优选-80℃下保存。

[0018] 第二方面,本发明提供上述的母乳源外泌体的制备方法得到的母乳源外泌体。

[0019] 第三方面,本发明还提供上述的母乳源外泌体的制备方法得到的母乳源外泌体在制备婴幼儿配方食品或药物中的应用。

[0020] 本发明的有益效果至少在于:本发明适合规模化制备母乳源外泌体,可以处理低至10mL,高达数千升的样本,而且实验对象为母乳,营养及研究应用价值更高。本发明方法制得的母乳源外泌体浓度和纯度较高。本发明没有超高速离心过程,减少了超速离心对外泌体的机械损伤,良好的保持了母乳源外泌体的形态完整性。

附图说明

[0021] 为了更清楚地说明本发明或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作一简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0022] 图1为本发明实施例1提供的母乳外泌体样品收集色谱图。

[0023] 图2为本发明实施例4提供的切向流超滤浓缩效果图。

[0024] 图3为本发明实施例1和对比例3提供的不同试剂前处理沉淀效果图。

[0025] 图4为本发明实施例1和对比例1-2提供的母乳源外泌体形态表征。

[0026] 图5为本发明实施例1和对比例1-2提供的母乳源外泌体粒径分布对比图。

[0027] 图6为本发明实施例1和实施例2提供的母乳源外泌体粒径分布对比图。

[0028] 图7为本发明实施例1和实施例3提供的母乳源外泌体粒径分布对比图。

[0029] 图8为本发明实施例1和实施例5提供的母乳源外泌体粒径分布对比图。

[0030] 图9为本发明实施例1和实施例6提供的母乳源外泌体粒径分布对比图。

[0031] 图10为本发明实施例1和实施例7提供的母乳源外泌体粒径分布对比图。

[0032] 图11为本发明实施例1、对比例1-2以及实施例3提供的WB检测母乳源外泌体特异性标志蛋白的表达。

[0033] 图12为本发明实施例1提供的粒径与保留时间关系图。

[0034] 图13为本发明实施例1和对比例2提供的母乳源外泌体HPLC色谱图。

具体实施方式

[0035] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0036] 在本发明中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值,这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说,各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间,以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围,这些数值范围应被视为在本发明中具体公开。

[0037] 本发明实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用装置、仪器、试剂等未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购买得到的常规产品。涉及到的实验试剂和原料均为市售品,试剂均为分析纯产品。

[0038] 本发明中,术语的名词解释如下:UC:超速离心法。TFF:切向流超滤。BE-SEC:多模式色谱法:主要利用安装有多模式色谱柱(HiScreen capto core 700)的层析仪精纯母乳源外泌体的方法。TSK gel G6000 PWXL柱:一种尺寸排阻色谱柱。本发明中,通过前处理+TFF+BE-SEC三部分结合的方法来获得大规模的、高浓度、高纯度以及具有形态完整性的母乳源外泌体,并对其进行表征鉴定,证明本发明方案具有的优势特点。

[0039] 本发明实施例中,主要材料与仪器:无水磷酸氢二钠(货号:S818100)、无水磷酸二氢钠(货号:S817780)均购自上海麦克林生化科技股份有限公司,PBS磷酸盐缓冲液干粉(货号:P1010)购自北京索莱宝科技有限公司;母乳采用人乳(成熟乳);仪器:切向流超滤系统采用德国Merck公司的蠕动泵和膜包夹具组合而成(型号:MILLIPORE);层析系统为ÄKTA avant 150 购自美国Cytiva公司;HiScreen capto core 700柱(型号:17548115),HiScreen capto core 400柱(型号:17372410)购自美国Cytiva公司;PES超滤膜包(300kDa)分别购自德国Merck公司(P2B300C01,0.1m^2)和杭州科百特过滤器材有限公司(型号:UFELA0300010P,0.11m^2);TSK gel G6000 PWXL柱(型号:0008024)购自东曹(上海)生物科技有限公司。

[0040] 实施例1

本实施例提供一种母乳源外泌体的制备方法,步骤如下:

1)前处理沉淀酪蛋白

(1)将母乳置于2000×g,4℃条件下离心15min去除脂肪,得到脱脂母乳。

[0041] (2)分别配制Na_2HPO_4和NaH_2PO_4溶液,按照一定的比例进行混合,最终得到0.5M(pH5.3,pH6.5,pH7.6),1.0M(pH5.2,pH6.3,pH7.6),2.0M(pH6.0,pH7.0,pH8.0)的磷酸钠溶液。

[0042] (3)将磷酸钠溶液(浓度1M,pH6.3)与脱脂母乳1:1等体积混合后4℃过夜沉淀蛋白。

[0043] (4)蛋白沉淀结束后,12000r/min,4℃离心20min,取上清依次通过0.8μm、0.45μm、0.22μm滤膜过滤。

[0044] 2)切向流超滤初纯浓缩母乳源外泌体

利用切向流超滤系统,搭配300kDa超滤膜包对经前处理后的母乳样品进行切向流超滤,实现样品的初纯与浓缩,具体如下:

(1)将进样端和回流段管道插入到盛有母乳上清液的进样瓶中,并往进样瓶中添加等体积的1×PBS缓冲溶液,进行等量置换,每隔十分钟收集透过端溶液,利用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定透过端蛋白浓度,直至透过液蛋白浓度为0后停止置换。

[0045] (2)将置换后的样品溶液循环多次过膜,直至样品体积浓缩至原来体积的1/10后停止过膜并收集,以备后续纯化和表征实验。

[0046] 3)多模式色谱柱精纯母乳源外泌体

使用安装有HiScreen capto core 700多模式色谱柱的层析系统对切向流超滤得到的初纯外泌体样品进行精纯,实现样品的进一步纯化与收集,具体如下:

(1)使用超纯水对系统先进行泵洗,必要时进行手动排气泡操作。

[0047] (2)连接HiScreen capto core 700多模式色谱柱,使用超纯水冲洗3个柱体积后,使用1×PBS平衡3个柱体积。

[0048] (3)将流速设置为进样流速2.0mL/min,选择多模式色谱柱所在柱位,柱压设置为0.8MPa,填料压力设置为0.3MPa后开始运行,观察UV基线是否处于平衡状态,待UV基线处于平衡状态时调零。

[0049] (4)用5mL注射器注射样品,开始进样,设置收集体积为1.5mL,收集温度6℃等条件后收集出峰样品,母乳外泌体样品收集色谱图如图1所示。

[0050] (5)收集完毕后,用超纯水冲洗3个柱体积,清洗液冲洗3个柱体积后,再用超纯水冲洗3个柱体积,最后冲洗20%乙醇溶液,使柱子保存在20%乙醇溶液环境中。

[0051] (6)收集到的样品使用50mL,50kDa超滤管于6000×g,20℃条件下离心15min,得到浓缩的母乳源外泌体样品后置于-80℃条件下进行储存。

[0052] 对比例1

本对比例提供一种母乳源外泌体的制备方法,采用同实施例1的方法,区别之处在于采用切向流超滤(TFF),不进行多模式色谱柱精纯母乳源外泌体。

[0053] 对比例2

多模式色谱柱精纯母乳源外泌体,采用超速离心法(UC),具体步骤如下:

(1)在37℃水浴锅中速融脱脂母乳样本。

[0054] (2)将母乳样本移动至一个新的离心管内,2000×g,4℃,离心30min。

[0055] (3)小心的将上清液移至新的离心管中,10000×g,4℃,再次离心45min,以去除较大的囊泡。

[0056] (4)取上清,经0.45μm滤膜过滤,收集过滤液。

[0057] (5)将过滤液转移至新的离心管中,选择超速转子,4℃,100000×g离心70min。

[0058] (6)去除上清,用1mL预冷的1×PBS重悬即为外泌体。

[0059] 对比例3

本对比例提供一种母乳源外泌体的制备方法,采用同实施例1的方法,区别之处在于1)前处理沉淀酪蛋白:采用柠檬酸钠和乙二胺四乙酸(EDTA)作为沉淀试剂。

[0060] 实施例2

本实施例提供一种母乳源外泌体的制备方法,采用同实施例1的方法,区别之处在于切向流超滤(TFF)采用的膜包,将实施例1采用的德国Merck公司的膜包(P2B300C01,0.1m^2)改为杭州科百特过滤器材有限公司的膜包(UFELA0300010P,0.11 m^2)。

[0061] 实施例3

本实施例提供一种母乳源外泌体的制备方法,采用同实施例1的方法,区别之处在于将切向流超滤采用的PES超滤膜包改为100kDa超滤膜包。

[0062] 实施例4

本实施例提供一种母乳源外泌体的制备方法,采用同实施例1的方法,区别之处在于将切向流超滤的直至蛋白透过率为“0”后进行浓缩的方式改为固定洗滤次数为5次,本实施例的浓缩效果如图2所示。

[0063] 实施例5

本实施例提供一种母乳源外泌体的制备方法,采用同实施例1的方法,区别之处在于将多模式色谱法纯化处理采用的HiScreen capto core 700多模式色谱柱替换为HiScreen capto core 400多模式色谱柱。

[0064] 实施例6

本实施例提供一种母乳源外泌体的制备方法,采用同实施例1的方法,区别之处在于将精纯后进行浓缩采用的50kDa超滤管替换为10kDa超滤管。

[0065] 实施例7

本实施例提供一种母乳源外泌体的制备方法,采用同实施例1的方法,区别之处在于多模式色谱法纯化处理中,进样流速为1.6mL/min,柱压为0.8MPa,填料压力为0.3MPa,收集温度为6℃。

[0066] 实施例8-15

本实施例提供一种母乳源外泌体的制备方法,采用同实施例1的方法,区别之处在于磷酸钠溶液浓度和pH不同,具体如表1。

[0067] 实施例16

本实施例提供一种母乳源外泌体的制备方法,采用同实施例1的方法,区别之处在于将前处理母乳样本体积由500mL替换为20L。

[0068] 实验例1

1)采用电镜观察法表征母乳源外泌体形态

利用透射电子显微镜观察不同工艺所制备外泌体样品的形态,操作如下:

(1)吸取样品10μL滴加于铜网上沉淀1min,滤纸吸去浮液。

[0069] (2)醋酸双氧铀10μL滴加于铜网上沉淀1min,滤纸吸去浮液。

[0070] (3)常温干燥数分钟。

[0071] (4)80kv进行电镜检测成像,并获得透射电镜成像结果。

[0072] 2)高效液相色谱法表征母乳源外泌体尺寸和纯度

通过高效液相色谱分析母乳外泌体样品中的蛋白杂质,同时验证本实验规模化制备方法的适用性和稳定性,操作步骤如下:

(1)按照仪器操作步骤开机,打开电脑软件并进行连接。

[0073] (2)连接保护柱及G6000PWXL柱,使用流动相平衡柱子至基线平稳。

[0074] (3)检测聚环氧乙烷(PEO)标准品的保留时间,并根据尺寸和保留时间拟合标准曲线,获得拟合公式。

[0075] (4)检测样品,将母乳外泌体样品12000r/min,4℃离心10min,将离心后的上清液过0.22μm囊式滤器后转移至样品瓶中,以1mL/min流速上样,设置上样体积为80μL,柱温30℃,UV280nm。

[0076] 3)蛋白免疫印迹表征母乳源外泌体特异性蛋白

通过蛋白免疫印记对收集的母乳源外泌体进行特异性蛋白的表征,以求对样本进行定性,其中抗体选择为:CD81、CD63、TSG101,详细步骤如下:

(1)制备的母乳外泌体样品中加入1.5μL PMSF和等量的RIPA裂解液,冰上裂解10min。

[0077] (2)12000r/min离心5min,取上清液。

[0078] (3)使用BCA蛋白浓度测定试剂盒对蛋白浓度进行定量。

[0079] (4)按1:4的比例加入5×loading buffer在100℃沸水中煮样10min。

[0080] (5)SDS-PAGE蛋白电泳:在预制胶中加入5μL Marker,按相同蛋白总量上样量计算每个样品的上样体积,接入正负电极,在140V恒压条件下,运行50min。

[0081] (6)利用半干转膜仪进行转模,将预制胶上的样品转移到PVDF膜上。

[0082] (7)封闭:将转膜后的PVDF膜放入5%脱脂牛奶中,摇床条件下,室温孵育1h。

[0083] (8)一抗孵育:封闭后的PVDF膜在一抗抗体中4℃孵育过夜。

[0084] (9)孵育后的膜用1×TBST溶液清洗3次,每次10min,摇床转速为40-50r/min。

[0085] (10)二抗孵育:清洗后的膜置于二抗溶液中室温孵育1-1.5h。

[0086] (11)孵育后的膜用1×TBST溶液清洗3次,每次10min,摇床转速为40-50r/min。

[0087] (12)显影检测:将配好的显影液滴加到PVDF膜上,并使显影液充分覆盖在膜上避光静置3min,置于显影仪中显影。

[0088] 4)纳米流式细胞术表征母乳源外泌体粒径和颗粒浓度

(1)将外泌体取出10μL稀释到合适倍数。

[0089] (2)先用标准品进行仪器性能测试合格后方可进行外泌体样品上样,注意需进行梯度稀释避免样本堵塞进样针。

[0090] (3)待样本完成检测即可获得仪器检测外泌体的粒径和浓度信息。

[0091] 测试结果如下:

1)前处理试剂及磷酸盐浓度及pH效果测试

由图3可以看出经磷酸钠(实施例1)处理的母乳产生明显分层,而柠檬酸钠和EDTA(对比例3)处理的母乳沉淀并不明显,且由表1可以清楚地看到,磷酸钠溶液浓度为1M,

pH6.3时的沉淀过滤效果最好。

[0092] 表1 磷酸钠沉淀法过滤情况

实施例	溶液名称	处理后变化	0.45μm 滤膜过滤		0.22μm 滤膜过滤	
			过滤阻力	澄清度	过滤阻力	澄清度
8	0.5M 磷酸钠 pH5.3	有絮状沉淀产生	较大	浑浊	最大	略澄清
9	0.5M 磷酸钠 pH6.5		小	基本澄清	较大	澄清
10	0.5M 磷酸钠 pH7.6		小	浑浊	大	澄清
11	1.0M 磷酸钠 pH5.2		较小	略澄清	较小	澄清
1	1.0M 磷酸钠 pH6.3		较小	基本澄清	小	澄清
12	1.0M 磷酸钠 pH7.6		无法过滤	浑浊	-	-
13	2.0M 磷酸钠 pH6.0		较大	浑浊	较大	基本澄清
14	2.0M 磷酸钠 pH7.0		小	澄清	较大	澄清
15	2.0M 磷酸钠 pH8.0		小	略澄清	较大	澄清
澄清度排序: 1 > 8=12=14 > 15 > 9 > 11 > 13						

[0093] 2)电镜表征母乳外泌体形态

切向流超滤(TFF)、超速离心法(UC)和切向流超滤+多模式色谱法(TFF+BE-SEC)制备的母乳源外泌体在透射电子显微镜(TEM)下均能观察到膜结构,呈现出茶托或圆盘状。但由图4可以看出经切向流超滤(对比例1)初纯后的母乳源外泌体中还是包含较多颗粒杂质,而后经多模式色谱柱(实施例1)精纯后的母乳源外泌体颗粒杂质明显减少,超速离心法(对比例2)得到的母乳源外泌体纯度介于两者之间,且观察到有被破坏的外泌体结构。

[0094] 3)纳米流式细胞术检测母乳外泌体的粒径、浓度和纯度

通过NanoFCM检测母乳源外泌体的颗粒粒径、浓度和纯度的结果显示:UC法(对比例2)获得的母乳源外泌体平均粒径为81nm,得率为2.46×10^{14}个颗粒/L 纯度为83%;TFF(对比例1)获得的母乳源外泌体平均粒径为79.1nm,得率为1.83×10^{14}个颗粒/L,纯度为67%;TFF+BE-SEC(实施例1)制备的母乳源外泌体直径大小较为集中,为50~120nm,外泌体平均粒径为77.9nm,得率为4.19×10^{14}个颗粒/L,纯度为93.5%;由此可以说明TFF+BE-SEC法制得的母乳源外泌体相对于其他两种方法来说,得率和纯度更高。粒径分布状况如图5所示。

[0095] 此外,与实施例1的外泌体平均粒径为77.9nm,得率为4.19×10^{14}个颗粒/L,纯度为93.5%相比,实施例2中采用科百特超滤膜包所制得的母乳源外泌体平均粒径为79.8nm,得率为3.98×10^{14}个颗粒/L,纯度为89.2%,粒径分布对比情况如图6所示;实施例3中采用100kDa孔径超滤膜包所制得的母乳源外泌体平均粒径为82.4nm,得率为1.98×10^{14}个颗粒/L,纯度为73%,粒径分布对比情况如图7所示;实施例5中采用Hiscreen capto core400多模式色谱柱所制得的母乳源外泌体平均粒径为78.3nm,得率为2.04×10^{14}个颗粒/L,纯度为80%,粒径分布对比情况如图8所示;实施例6中采用10kDa孔径超滤管浓缩得到的母乳源外泌体平均粒径为78.1nm,得率为3.21×10^{14}个颗粒/L,纯度为85.2%,粒径分布对比情况如图9所示;实施例7中采用1.6mL/min进样流速得到的母乳源外泌体平均粒径为77.5nm,得率为2.71×10^{14}个颗粒/L,纯度为81.7%,粒径分布对比情况如图10所示。

[0096] 4)母乳外泌体特异性蛋白标志物表达

通过WB法检测结果表明:TFF(对比例1)、UC(对比例2)以及TFF和BE-SEC结合的方

法分别从500mL(实施例1)和20L(实施例16)母乳样本中制备的母乳源外泌体的特异性蛋白标志物CD81、CD63和TSG101均得到了表达。见图11。

[0097] 5)高效液相色谱法纯度分析

采用HPLC检测外泌体样品中游离蛋白(粒径小于外泌体尺寸)含量。根据母乳外泌体的平均粒径带入图12拟合曲线中可以得到所得母乳外泌体中在TSKgel G6000 PWXL柱上的保留时间均为8.6min左右。但TFF与BE-SEC(实施例1)提取的外泌体样品较UC(对比例2)所得样品的杂质峰(RT>8.6min)比例更小,TFF+BE-SEC所得终产物更体现为单一峰。见图13。

[0098] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

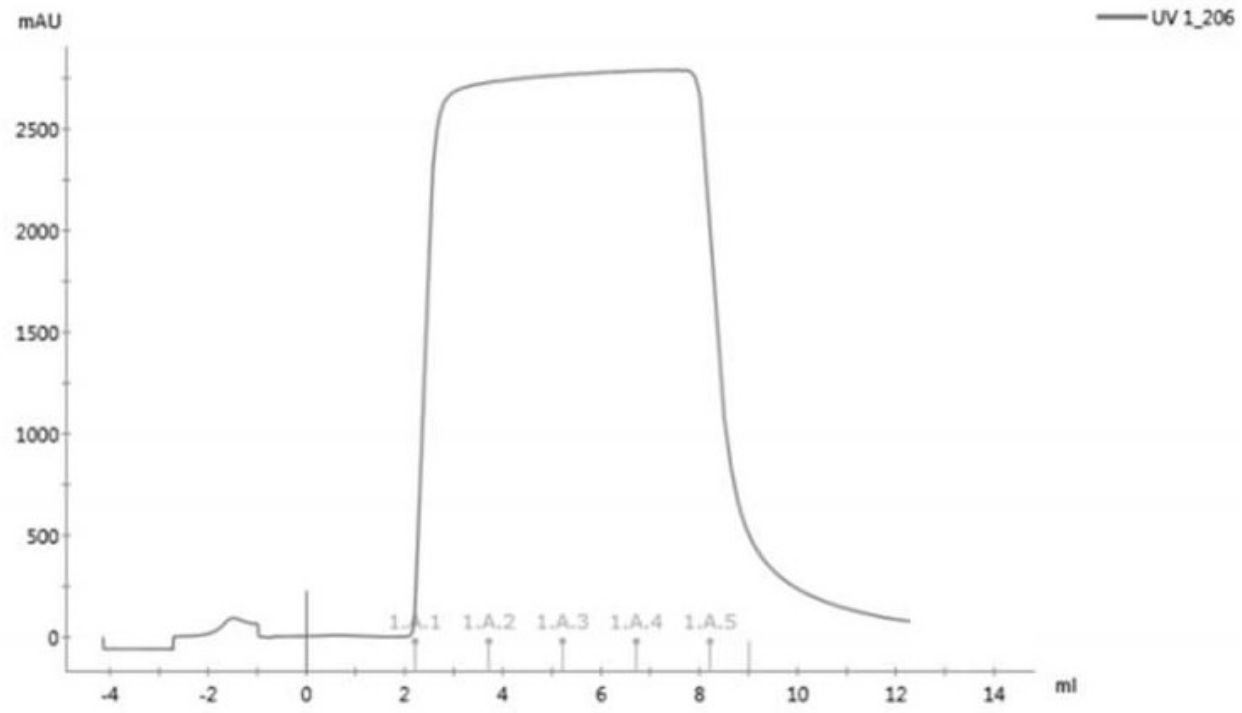

mAU
UV 1_206
2500
2000
1500
1000
500
0
1.A.1
1.A.2
1.A.3
1.A.4
1.A.5
-4
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
ml

图 1

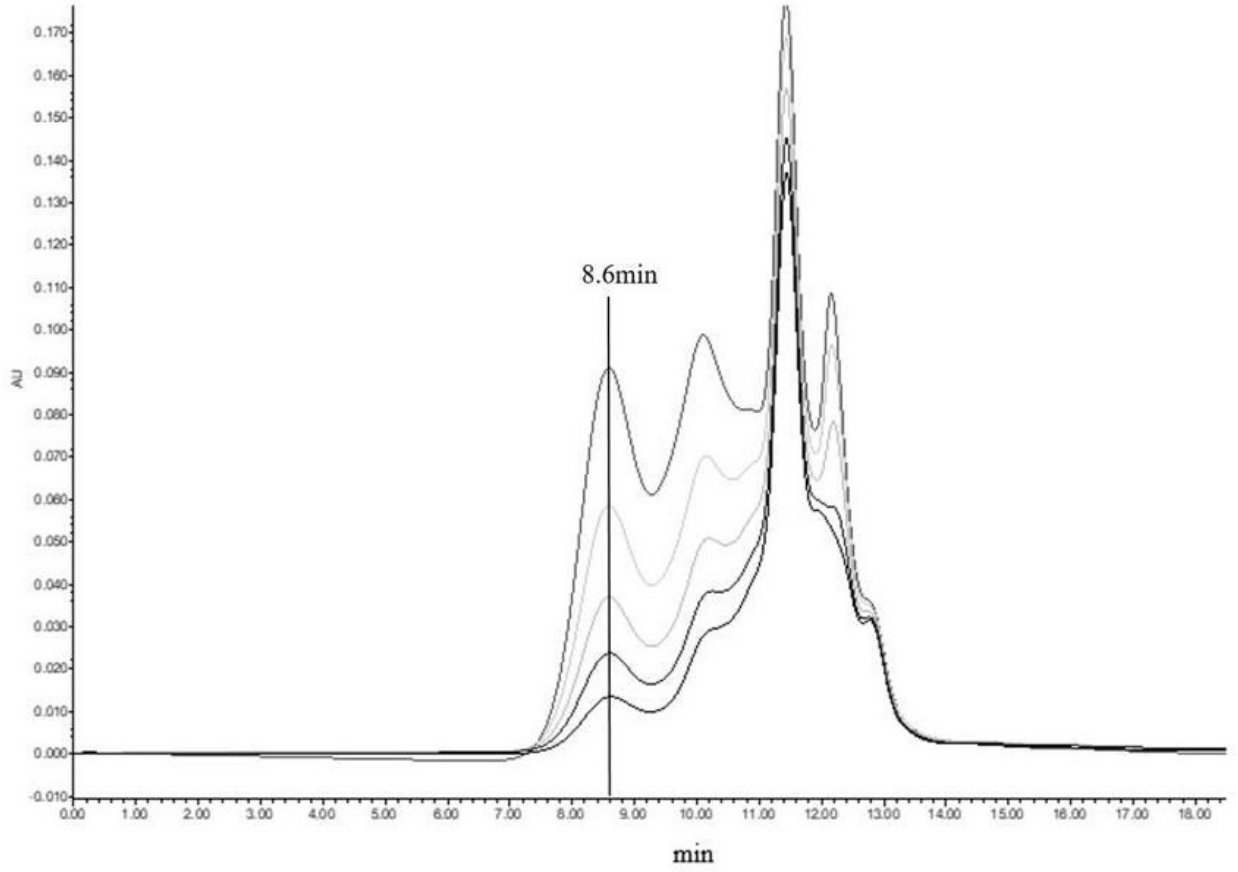


图 2



图 3

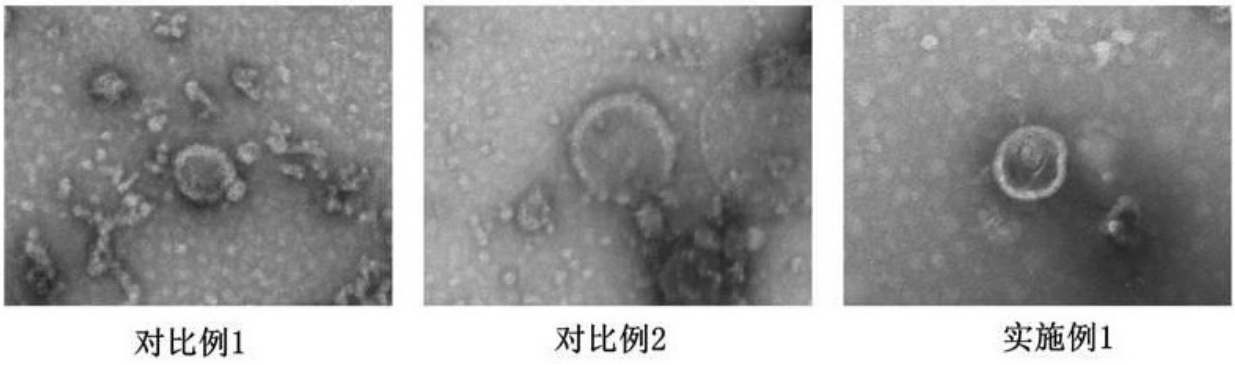

对比例1
对比例2
实施例1

图 4

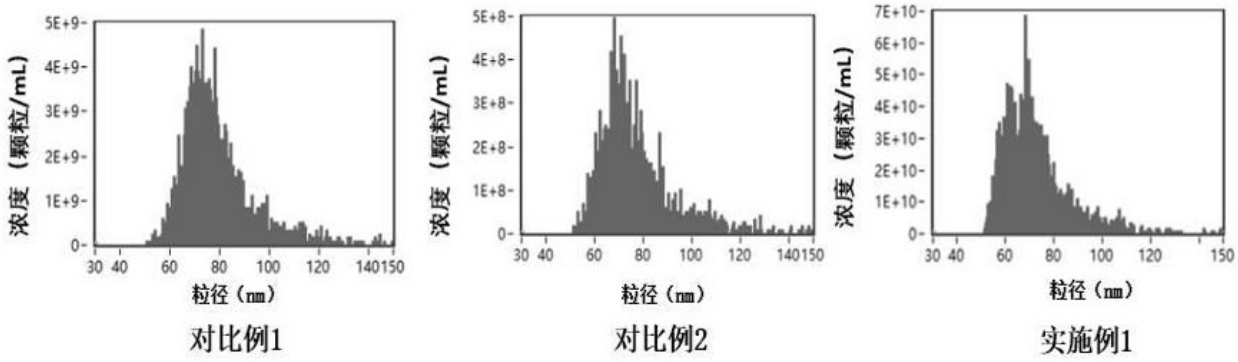

浓度（颗粒/mL）
粒径（nm）
对比例1
对比例2
实施例1

图 5

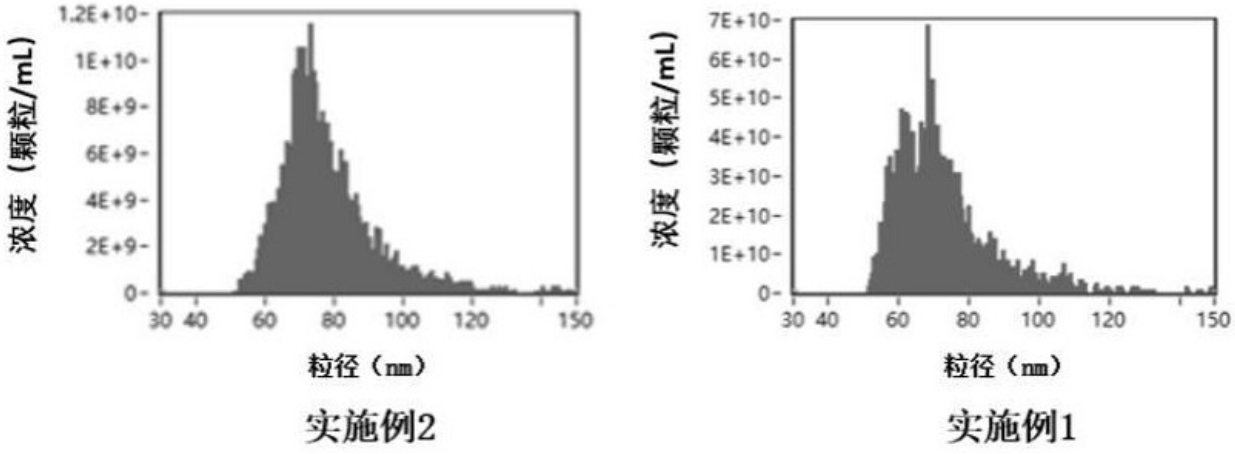

浓度（颗粒/mL）
粒径（nm）
实施例2
实施例1

图 6

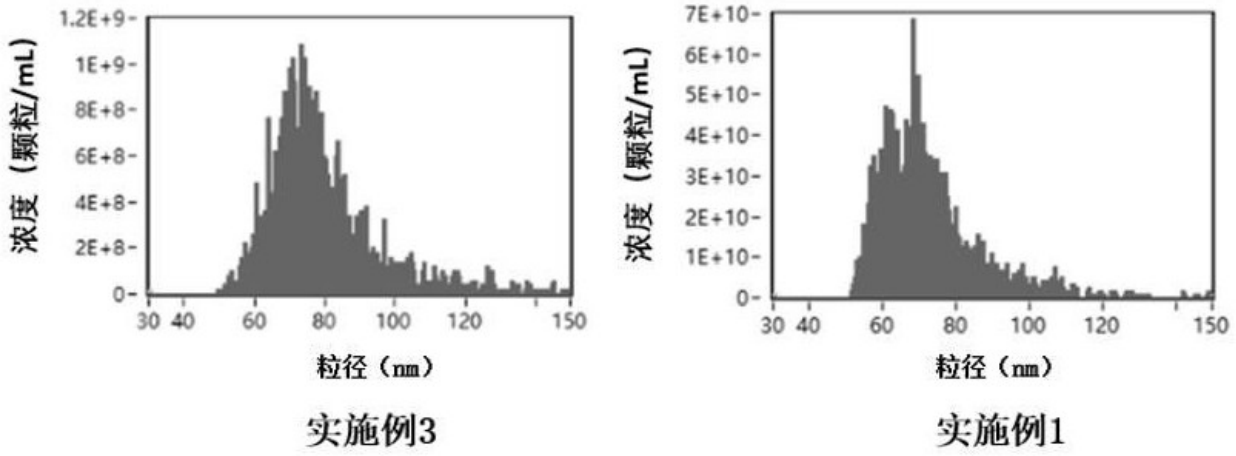

浓度（颗粒/mL）
1.2E+9
1E+9
8E+8
6E+8
4E+8
2E+8
0
30 40 60 80 100 120 150
粒径（nm）
实施例3
浓度（颗粒/mL）
7E+10
6E+10
5E+10
4E+10
3E+10
2E+10
1E+10
0
30 40 60 80 100 120 150
粒径（nm）
实施例1

图 7

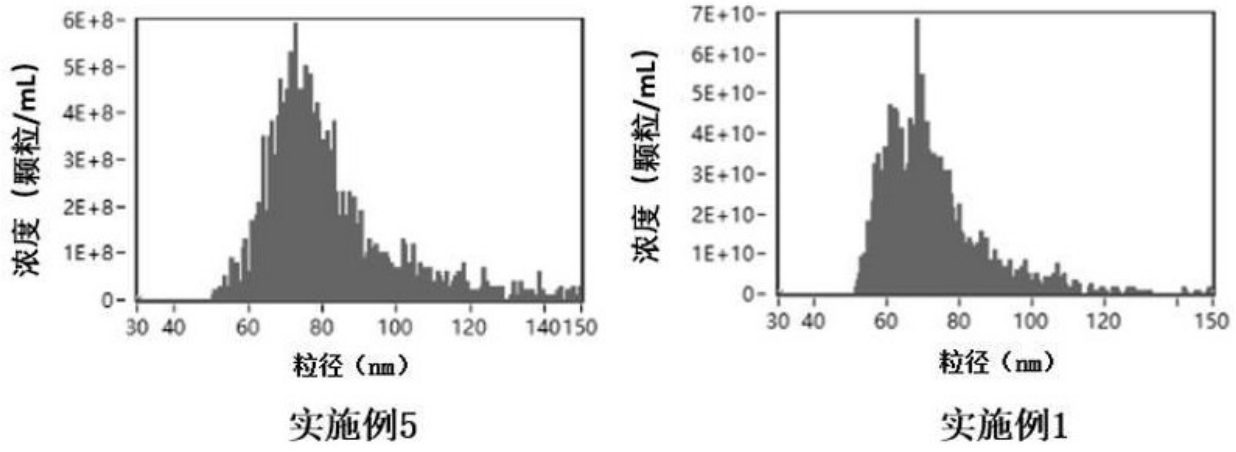

浓度（颗粒/mL）
6E+8
5E+8
4E+8
3E+8
2E+8
1E+8
0
30 40 60 80 100 120 140 150
粒径（nm）
实施例5
浓度（颗粒/mL）
7E+10
6E+10
5E+10
4E+10
3E+10
2E+10
1E+10
0
30 40 60 80 100 120 150
粒径（nm）
实施例1

图 8

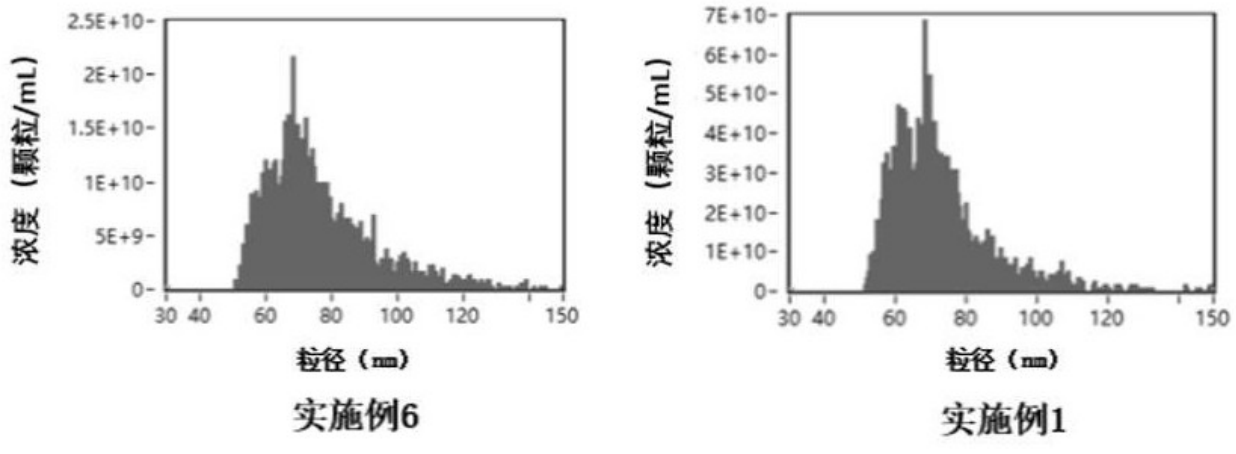

浓度（颗粒/mL）
2.5E+10
2E+10
1.5E+10
1E+10
5E+9
0
30 40 60 80 100 120 150
粒径（nm）
实施例6
浓度（颗粒/mL）
7E+10
6E+10
5E+10
4E+10
3E+10
2E+10
1E+10
0
30 40 60 80 100 120 150
粒径（nm）
实施例1

图 9

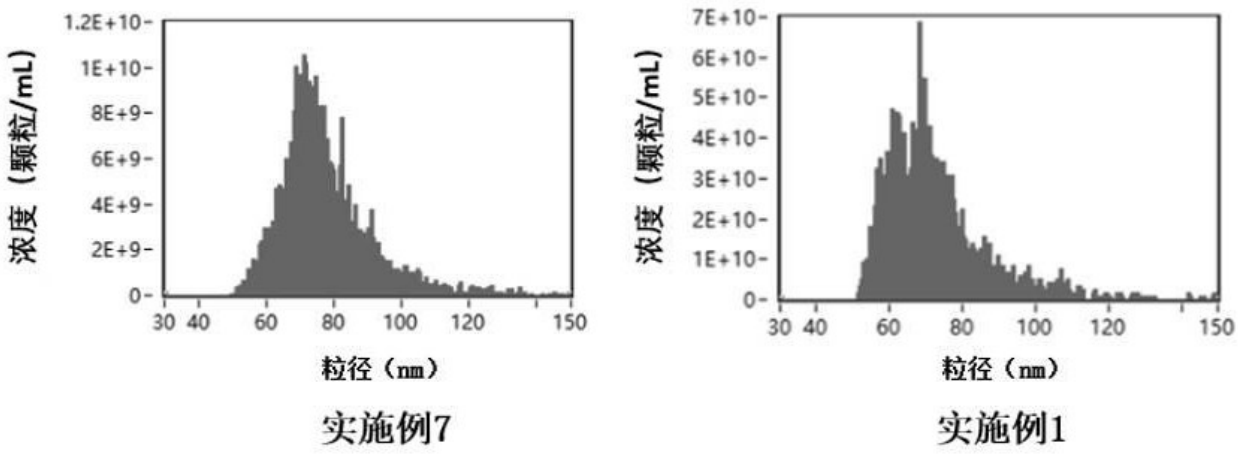

浓度（颗粒/mL）
1.2E+10
1E+10
8E+9
6E+9
4E+9
2E+9
0
30 40 60 80 100 120 150
粒径（nm）
实施例7
浓度（颗粒/mL）
7E+10
6E+10
5E+10
4E+10
3E+10
2E+10
1E+10
0
30 40 60 80 100 120 150
粒径（nm）
实施例1

图 10

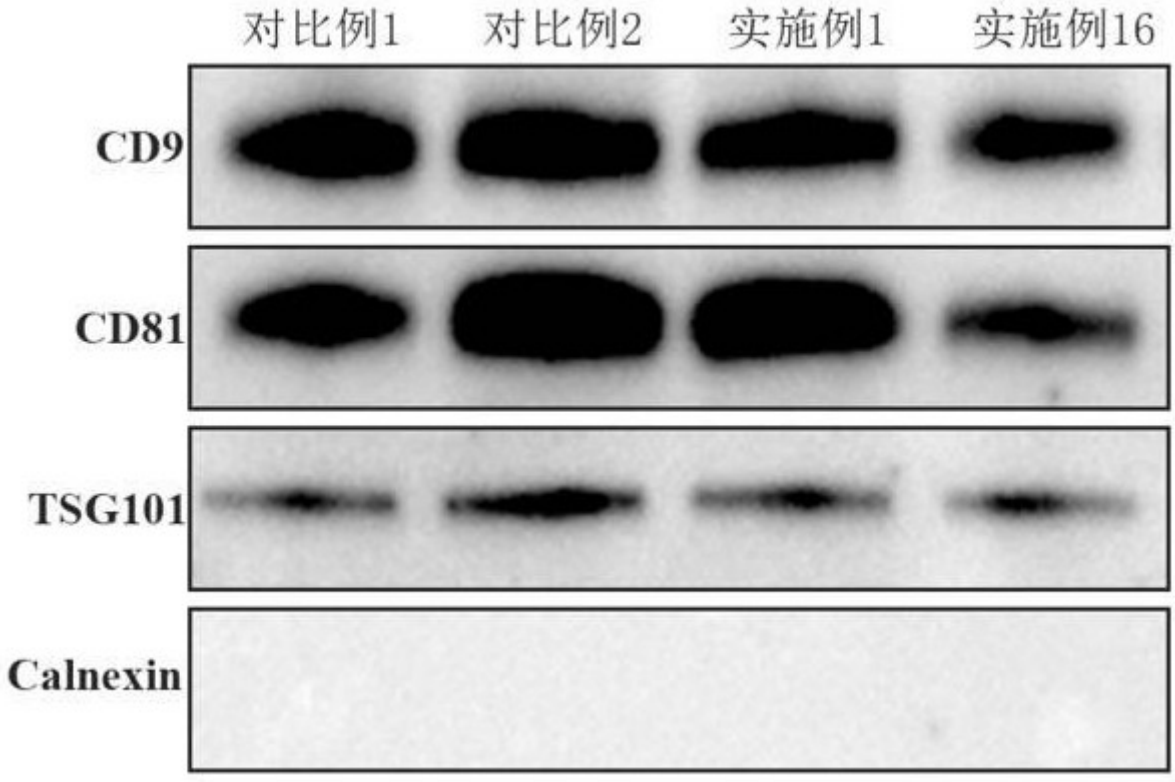

对比例1
对比例2
实施例1
实施例16
CD9
CD81
TSG101
Calnexin

图 11

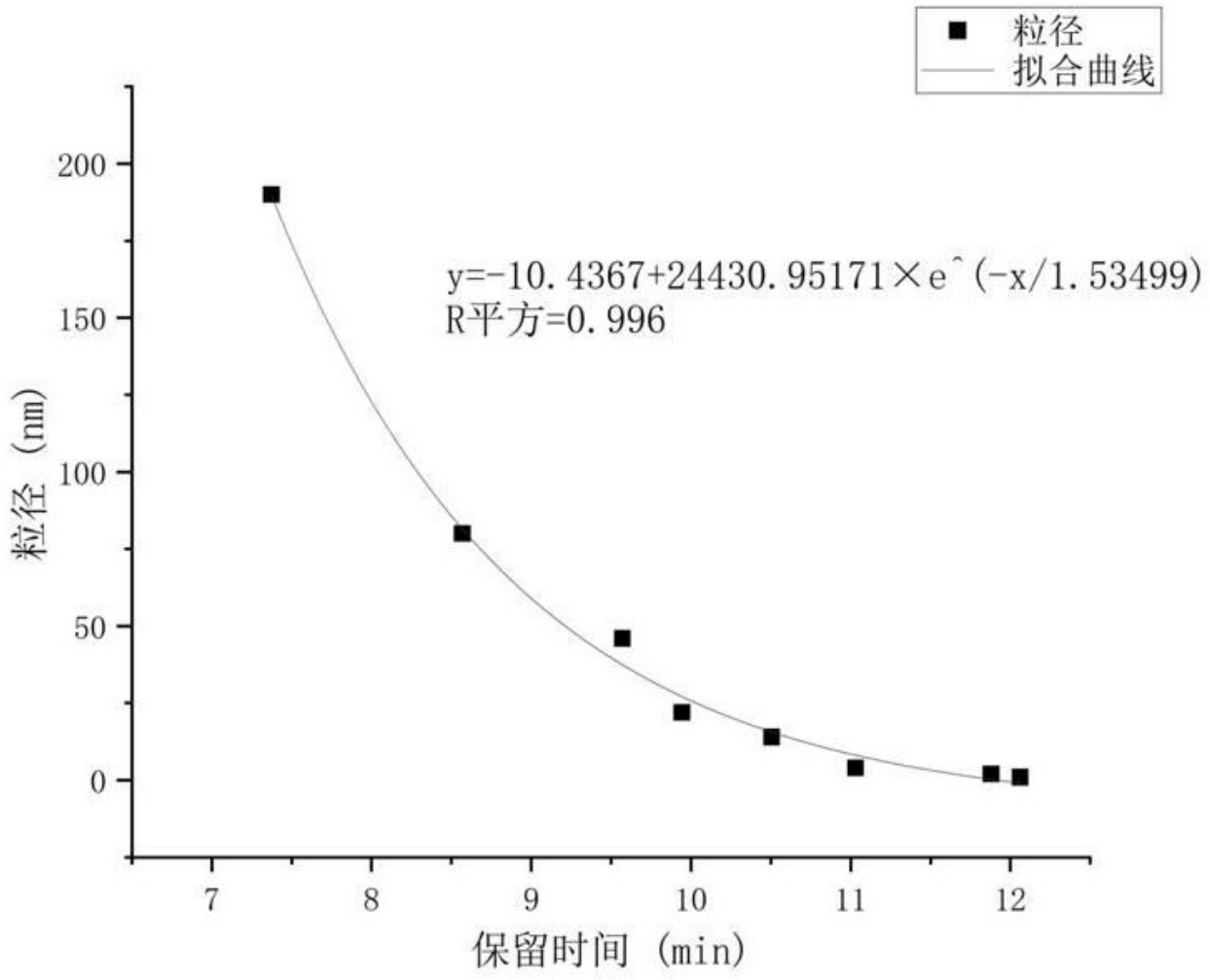

粒径
拟合曲线
y=-10.4367+24430.95171×e^(-x/1.53499)
R平方=0.996
粒径 (nm)
保留时间 (min)
200
150
100
50
0
7
8
9
10
11
12

图 12

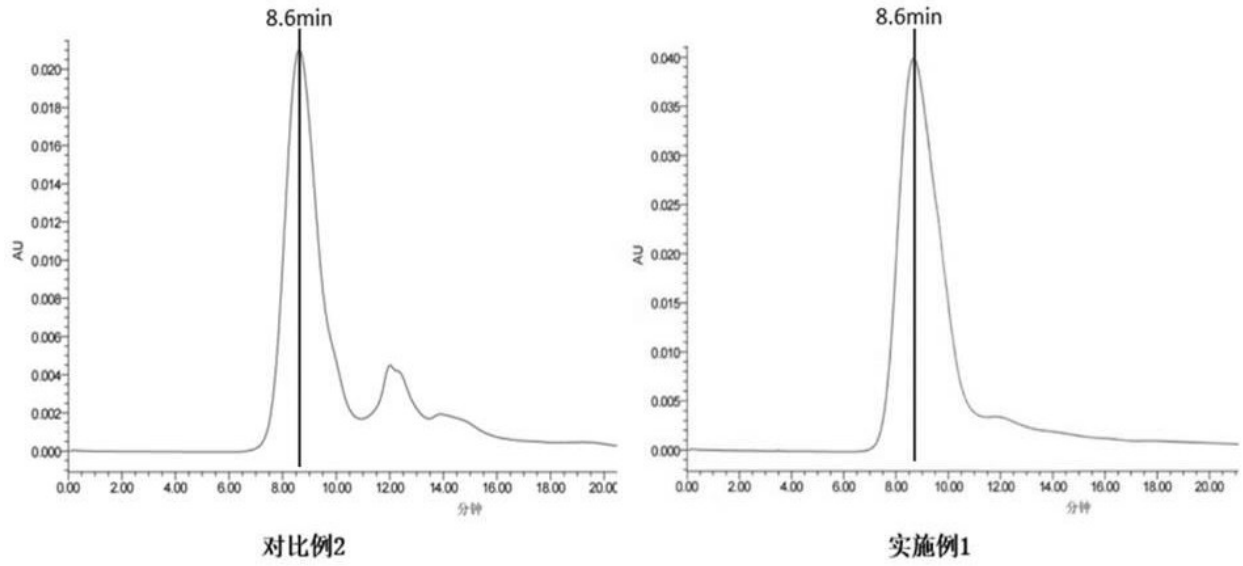

8.6min
AU
分钟
对比例2
8.6min
AU
分钟
实施例1

图 13