



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112831457 A

(43) 申请公布日 2021.05.25

(21) 申请号 202110178197.8

(22) 申请日 2021.02.07

(71) 申请人 辽宁润基生物科技有限公司

地址 110000 辽宁省沈阳市沈阳市经济技术
开发区十三号路77-20号(2门)

(72) 发明人 李萍 肖木亮 高秀春 王绍成

(74) 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司 21002

代理人 李颖

(51) Int.Cl.

G12N 5/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图7页

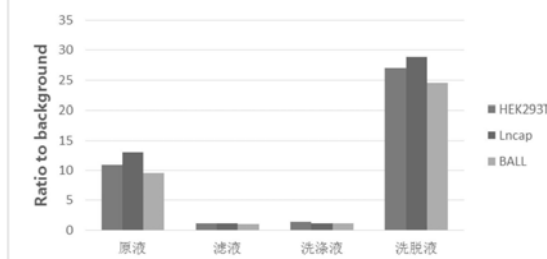
(54) 发明名称

一种分离和浓缩外泌体的方法

(57) 摘要

本发明属于生物检测技术领域,是一种快速分离和浓缩外泌体的方法。通过阴离子交换树脂与样本中外泌体相结合的方式,实现从样本中分离获得外泌体颗粒。本发明方法操作简单,时间短,成本低,重复性好,可快速将样本中外泌体浓缩成小体积,一般可浓缩20~40倍,且外泌体颗粒几乎不丢失。便于大体积、低浓度样本中外泌体的提取,适用于粒径分析、电镜检测、Western blot、外泌体DNA和RNA提取等相关的下游实验。

分离和浓缩细胞培养液外泌体各成分ELISA测试对比图



1. 一种分离和浓缩外泌体的方法,其特征在于:

S1. 向含外泌体的样本中加入结合缓冲液;

S2. 向上述体系中加入结合树脂使其与样品中外泌体结合;

S3. 利用洗涤液洗涤上述的结合树脂;

S4. 再用含高浓度盐溶液的洗脱液洗脱结合树脂,即获得样品中外泌体。

2. 按权利要求1所述方法,其特征在于:所述样本为细胞培养上清液或生物体液;

其中,当样本为细胞培养上清液时,细胞培养上清液需1500g,4℃离心15min,弃沉淀,上清液过0.22μm滤膜备用;

当样本为生物体液时,生物体液需3000g,4℃离心15min,弃沉淀,上清液过0.22μm滤膜备用。

3. 按权利要求1所述方法,其特征在于:所述结合缓冲液与样本的体积比为1/25~1/5;其中,所述结合缓冲液为pH为7.0~8.5的Tris缓冲液或磷酸盐缓冲液或MOPES缓冲液;其中,当所述结合缓冲液为Tris缓冲液时,Tris浓度为50~500mM,可用HCl调pH为7.0~8.5;当所述结合缓冲液为磷酸盐缓冲液时,NaCl浓度为20~100mM,KCl浓度为0.5~6mM,Na₂HPO₄浓度为1~10mM,KH₂PO₄浓度为0.5~20mM,pH为7.0~8.5;当所述结合缓冲液为MOPES缓冲液时,MOPES浓度为10~100mM,乙酸钠浓度为5~100mM,EDTA浓度5~100mM,pH为7.0~8.5。

4. 按权利要求1或3所述方法,其特征在于:所述结合缓冲液与样本混合均匀后孵育5~20min。

5. 按权利要求1所述方法,其特征在于:所述结合树脂与样本体积比为1/50~1/10;其中,结合树脂为弱阴离子交换树脂或强阴离子交换树脂;所述树脂以聚丙烯酸酯或琼脂糖或纤维素或聚苯乙烯作为基质,所述基质经-(CH₂)₂N(CH₃)₂或-(CH₂)₂N⁺(CH₃)₃修饰获得弱阴离子交换树脂或强阴离子交换树脂。

6. 按权利要求1或5所述方法,其特征在于:所述步骤S2中结合树脂与样本体系混合均匀后,室温孵育10~60min,1500~3000g离心2~5min。

7. 按权利要求1所述方法,其特征在于:所述洗涤液是pH为6.8~8.3的HEPES缓冲液或磷酸盐缓冲液或Tris缓冲液;其中,当所述洗涤液为HEPES缓冲液时,HEPES的浓度为50~500mM,pH为6.8~8.3;当所述洗涤液为磷酸盐缓冲液时,NaCl浓度为20~100mM,KCl浓度为0.5~6mM,Na₂HPO₄浓度为1~10mM,KH₂PO₄浓度为0.5~10mM,pH为6.8~8.3;当所述洗涤液为Tris缓冲液时,Tris浓度为50~500mM,可用HCl调pH为6.8~8.3。

8. 按权利要求1或7所述方法,其特征在于:所述步骤S3中将洗涤液加入纯化柱中,孵育1~5min,1500~3000g离心2~5min,弃滤液。

9. 按权利要求1所述方法,其特征在于:所述洗脱液是pH为6.3~7.4含高浓度NaCl的HEPES缓冲液或磷酸盐缓冲液或Tris缓冲液;其中,当所述洗脱液为高浓度NaCl的HEPES缓冲液时,NaCl浓度为100~700mM,HEPES的浓度为50~500mM,pH为6.3~7.4;

当所述洗脱液为高浓度NaCl的磷酸盐缓冲液时,NaCl浓度为100~700mM,KCl浓度为0.5~10mM,Na₂HPO₄浓度为1~20mM,KH₂PO₄浓度为0.5~10mM,pH为6.3~7.4;当所述洗脱液为高浓度NaCl的Tris缓冲液时,NaCl浓度为100~700mM,Tris浓度为50~500mM,可用HCl调pH为6.3~7.4。

10. 按权利要求1或9所述方法,其特征在于:所述步骤S4中将洗脱液加入纯化柱中,孵

育3~7min,200~500g离心2~5min,将滤液重新加入纯化柱中,孵育3~7min,1500~3000g离心2~5min。

一种分离和浓缩外泌体的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,是一种快速分离和浓缩外泌体的方法。

背景技术

[0002] 外泌体是一种由活细胞分泌,含有丰富的蛋白质、核酸、脂质双分子层结构的微小囊泡,直径在30~150nm之间。外泌体在机体内广泛存在,如尿液、腹水、血液、细胞培养液、脑脊液等各种体液中。外泌体能递送有功能的分子,包括蛋白质、脂质和核酸给受体细胞,参与细胞间通讯,影响细胞的各种生理与病理功能,所以受到了很多科研人员的关注,在深入进行外泌体研究前,需要分离得到一定浓度的外泌体至关重要。

[0003] 现有技术中的超速离心法分离外泌体是目前最普遍的一种方法,该方法被广泛应用于血清、血浆、细胞培养液、尿液等样品的分离,也是目前分离方法中的金标准,可用于大体积、低浓度样本中外泌体的提取,但费时费力,外泌体的结构和功能很容易遭到破坏,且回收率较低。密度梯度离心法是在长时间超速离心力下,利用不同密度的介质从低到高连续分布形成密度梯度阶层,根据外泌体的密度获得外泌体的方法,但操作繁琐,重复性差,并且以上方法需要配备各种昂贵的超高速离心机,不适合大批量提取外泌体。超滤法是利用不同孔径的超滤膜对样本中的外泌体进行分离,进而得到外泌体,此方法成本高,适用于小体积样本中外泌体的浓缩,不利于大体积、低浓度样本中外泌体的提取。聚合物沉淀法是利用高分子聚合物竞争外泌体周围的水分,从而使外泌体聚集,可进行大体积、低浓度样本的外泌体浓缩,操作简便,成本低,但含杂蛋白较多,产生难以去除的聚合物,影响下游实验的分析。免疫亲和法是利用相应抗体与外泌体膜蛋白质间的特异性相互作用,实现对外泌体的富集,但此方法中的磁珠和抗体较为昂贵,保存条件苛刻,也不利于大体积、低浓度样本中外泌体的提取。分子排阻法是利用外泌体的颗粒大小来分离,可去除部分颗粒小的蛋白质组分,起到很好的分离纯化作用,但不适合大体积样本中外泌体的提取。离子交换层析法是利用离子交换树脂作为填料装填层析柱,根据蛋白质所带电荷的不同,进行蛋白质的分离,加样后,通过调节流动相的不同盐浓度,将吸附在柱子上的蛋白质洗脱下来,收集洗脱液的馏分,起到很好的纯化作用,但针对外泌体浓度很低的细胞培养上清液或生物体液这类样本,装填柱式离子交换层析很难实现其外泌体的浓缩,不利于下游外泌体的应用。

[0004] 因此针对细胞培养上清液或生物体液样本,迫切需要开发一种操作简便、低成本、稳定高效的分离和浓缩外泌体的方法。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有样本,例如细胞培养上清液或生物体液,外泌体含量很低,样本体积大,样本成分复杂,其外泌体难提取的不足,提供一种新型的快速分离和浓缩外泌体的方法,即利用阴离子交换树脂无需装填层析柱式提取外泌体的方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明实施的技术方案如下:

[0007] 一种分离和浓缩外泌体的方法:

- [0008] S1.向含外泌体的样本中加入结合缓冲液;
- [0009] S2.向上述体系中加入结合树脂使其与样品中外泌体结合;
- [0010] S3.利用洗涤液洗涤上述的结合树脂,去除杂蛋白;
- [0011] S4.再用含高浓度盐溶液的洗脱液洗脱结合树脂,即获得样品中外泌体。
- [0012] 所述样本为细胞培养上清液或生物体液;其中,当样本为细胞培养上清液时,细胞培养上清液需1500g,4℃离心15min,弃沉淀,上清液过0.22μm滤膜备用;
- [0013] 当样本为生物体液时,生物体液需3000g,4℃离心15min,弃沉淀,上清液过0.22μm滤膜备用。
- [0014] 所述结合缓冲液与样本的体积比为1/25~1/5;其中,所述结合缓冲液可以是pH为7.0~8.5的Tris缓冲液或磷酸盐缓冲液或MOPES缓冲液。
- [0015] 当所述结合缓冲液为Tris缓冲液时,Tris浓度为50~500mM,可用HCl调pH为7.0~8.5;
- [0016] 当所述结合缓冲液为磷酸盐缓冲液时,NaCl浓度为20~100mM,KCl浓度为0.5~6mM,Na₂HPO₄浓度为1~10mM,KH₂PO₄浓度为0.5~20mM,pH为7.0~8.5;
- [0017] 当所述结合缓冲液为MOPES缓冲液时,MOPES浓度为10~100mM,乙酸钠浓度为5~100mM,EDTA浓度5~100mM,pH为7.0~8.5。
- [0018] 所述结合缓冲液与样本混合均匀后孵育5~20min。
- [0019] 所述结合树脂与样本体积比为1/50~1/10;其中,结合树脂为弱阴离子交换树脂或强阴离子交换树脂,使其与样品中的外泌体进行结合。
- [0020] 所述树脂以聚丙烯酸酯或琼脂糖或纤维素或聚苯乙烯作为基质,所述基质经-(CH₂)₂N(CH₃)₂修饰获得弱阴离子交换树脂;或基质经-(CH₂)₂N⁺(CH₃)₃修饰获得强阴离子交换树脂。
- [0021] 所述步骤S2中结合树脂与样本体系混合均匀后,室温孵育10~60min,1500~3000g离心2~5min。
- [0022] 所述洗涤液是pH为6.8~8.3的HEPES缓冲液或磷酸盐缓冲液或Tris缓冲液。
- [0023] 当所述洗涤液为HEPES缓冲液时,HEPES的浓度为50~500mM,pH为6.8~8.3;
- [0024] 当所述洗涤液为磷酸盐缓冲液时,NaCl浓度为20~100mM,KCl浓度为0.5~6mM,Na₂HPO₄浓度为1~10mM,KH₂PO₄浓度为0.5~10mM,pH为6.8~8.3;
- [0025] 当所述洗涤液为Tris缓冲液时,Tris浓度为50~500mM,可用HCl调pH为6.8~8.3。
- [0026] 所述步骤S3中将洗涤液加入纯化柱中,孵育1~5min,1500~3000g离心2~5min,弃滤液。
- [0027] 所述洗脱液是pH为6.3~7.4含高浓度NaCl的HEPES缓冲液或磷酸盐缓冲液或Tris缓冲液。
- [0028] 当所述洗脱液为高浓度NaCl的HEPES缓冲液时,NaCl浓度为100~700mM,HEPES的浓度为50~500mM,pH为6.3~7.4;
- [0029] 当所述洗脱液为高浓度NaCl的磷酸盐缓冲液时,NaCl浓度为100~700mM,KCl浓度为0.5~10mM,Na₂HPO₄浓度为1~20mM,KH₂PO₄浓度为0.5~10mM,pH为6.3~7.4;
- [0030] 当所述洗脱液为高浓度NaCl的Tris缓冲液时,NaCl浓度为100~700mM,Tris浓度为50~500mM,可用HCl调pH为6.3~7.4。

[0031] 所述步骤S4中将洗脱液加入纯化柱中,孵育3~7min,200~500g离心2~5min,将滤液重新加入纯化柱中,孵育3~7min,1500~3000g离心2~5min。

[0032] 本发明可具有以下有益效果:

[0033] 通过本发明方法可将外泌体含量很低的细胞培养上清液或生物体液中的外泌体浓缩成小体积,操作简单,成本低,用时短,结果稳定,得到的外泌体浓缩液除了含有盐离子,没有聚合物的污染,省时又省力。

附图说明

[0034] 图1为本发明所述的从细胞培养液中分离和浓缩外泌体时各成分的ELISA测试对比图。

[0035] 图2为本发明所述的从细胞培养液中分离和浓缩外泌体的Western Blot鉴定图。

[0036] 图3为本发明所述的从细胞培养液中分离和浓缩外泌体的透射电镜鉴定图;图3-1HEK293T,图3-2Lncap;图3-3BALL。

[0037] 图4为本发明所述的从细胞培养液中分离和浓缩外泌体的NTA鉴定图;图4-1HEK293T,图4-2Lncap,图4-3BALL。

[0038] 图5为本发明所述的从尿液样本中分离和浓缩外泌体时各成分ELISA测试对比图。

[0039] 图6为本发明所述的从尿液样本中分离和浓缩外泌体的Western Blot鉴定图。

[0040] 图7为本发明所述的从尿液样本中分离和浓缩外泌体的透射电镜鉴定图;图7-1尿液A,图7-2尿液B。

[0041] 图8为本发明所述的从尿液样本中分离和浓缩外泌体的NTA鉴定图;图8-1尿液A,图8-2尿液B。

[0042] 具体实施实例

[0043] 以下结合实例对本发明的具体实施方式做进一步说明,应当指出的是,此处所描述的具体实施方式只是为了说明和解释本发明,并不局限于本发明。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0044] 本发明所使用的离子交换树脂为阴离子交换树脂,其以聚合物(琼脂糖、纤维素)为基质,该基质经过表面亲水改性后再键合离子交换基团,同时具备了对生物活性大分子良好的相容性和优秀的物理及化学稳定性,极大地提高了纯化效率。离子交换剂主要由高分子聚合物基质、电荷基团和平衡离子三部分组成。电荷基团与高分子聚合物共价结合,形成一个带电的可进行离子交换的基团。平衡离子是结合于电荷基团上的相反离子,它能与溶液中其它的离子基团发生可逆的交换反应。阴离子交换剂的作用是指平衡离子带负电的离子交换剂能与带负电的离子基团发生交换。

[0045] 本发明利用阴离子交换树脂的离子交换作用,即样品中的外泌体经结合缓冲液调节后使外泌体外膜上的蛋白质带上负电荷,与带正电荷的阴离子交换树脂结合,因外泌体外膜上含有丰富的蛋白质,所以外泌体与阴离子交换树脂的结合位点比单个游离蛋白质多,且结合更牢固。洗涤时,调节洗涤液的盐浓度和pH,去除大部分游离的蛋白质,因游离的蛋白质与阴离子交换树脂结合位点少,所以更易去除,再由含高浓度盐溶液的洗脱液洗脱,从而从样品中获得大量外泌体。

[0046] 本发明采用的试剂和设备为本技术领域常规试剂和设备,ELISA检测试剂盒为购自辽宁润基生物科技有限公司的人总外泌体捕获和定量试剂盒(细胞培养上清液)和人总外泌体捕获和定量试剂盒(尿液)。以下实施例所用试剂、材料和仪器均可从商业途径得到。

[0047] 实施例1

[0048] 从细胞培养液中分离和浓缩外泌体的方法

[0049] 对HEK293T (DMEM) /Lncap (RPM1640) /BALL (RPM1640) 三种细胞系培养上清液进行外泌体提取并鉴定。

[0050] (1) 取10ml不同细胞培养液 (HEK293T/Lncap/BALL) 在4℃,1500g离心10min,去除悬浮细胞和细胞碎片,上清液过0.22μm孔径滤膜,去除较大的微囊泡,分别吸取5ml细胞培养液于不同10ml离心管中(分别记作样品:HEK293T、Lncap、BALL)。

[0051] (2) 移液器吸取500μl结合缓冲液加入到(1)中装有培养液的离心管中,盖紧盖子,颠倒混匀。其中,结合缓冲液为200mM Tris-HCl缓冲液(pH8.0)。

[0052] (3) 吸取300μl结合树脂加入到(2)中的离心管中,盖紧盖子,在室温下连续颠倒混匀,孵育15min,1500g离心2min,轻轻将离心管从离心机中取出,用移液器取500μl上清液(不要弃掉),小心倒掉剩余上清液,用移液器中的液体(500μl)轻轻吹起树脂,全部转移至纯化柱中(已放入收集管),静置2min,2,000g室温离心2min,弃去滤液及收集管。其中,结合树脂为以琼脂糖为基质,化学结构为 $-(CH_2)_2N(CH_3)_2$ 的阴离子交换树脂,可按照现有技术中记载制备获得,或是购自sigma。

[0053] (4) 吸取500μl的洗涤液加入到纯化柱中,静止5min,2000g室温离心2min,将滤液及收集管一并弃掉。其中,洗涤液为68mM HEPES缓冲液,pH为7.4。

[0054] (5) 将纯化柱转移至低吸附蛋白的1.5ml离心管中,加入200μl的洗脱液,孵育5min,350g室温离心2min,将洗脱液重新转移至纯化柱中,孵育5min,2500g室温离心3min,离心管中所得液体即为浓缩后的外泌体溶液。其中,洗脱液为450mMNaCl,5.6mMKCl,5.2mMNa₂HPO₄,6mM KH₂PO₄磷酸盐缓冲液,pH为6.5。

[0055] (6) 外泌体ELISA定量检测

[0056] 通过ELISA(人总外泌体捕获和定量试剂盒,产品编号RGEX0C96-1)实验对各样本中是否有外泌体存在进行验证(读数参见表1,结果图参见图1),同时以PBS作为阴性对照。

[0057] 表1

	HEK293T	Lncap	BALL
原液(OD ₄₅₀ 值)	0.625	0.745	0.543
滤液(OD ₄₅₀ 值)	0.063	0.065	0.059
洗涤液(OD ₄₅₀ 值)	0.078	0.065	0.064
洗脱液(OD ₄₅₀ 值)	1.542	1.643	1.401

[0059] 通过ELISA实验检测,阴性对照OD₄₅₀为0.057,由表1可知,细胞培养液样本HEK293T/Lncap/BALL的滤液OD₄₅₀分别为0.063,0.065,0.059,其与阴性对照基本保持一致。即在5ml细胞培养液样本中加入300μl结合树脂可将样本中外泌体几乎全部捕获。样本HEK293T/Lncap/BALL的洗涤液OD₄₅₀分别为0.078,0.065,0.064,说明洗涤时外泌体几乎未丢失。由图1可知,分离和浓缩三种细胞培养液的洗脱液值明显高于原液,说明洗脱液中含有大量的外泌体,其相对于原液体积而言,外泌体可浓缩约25倍。

[0060] (7) BCA蛋白定量检测

[0061] 通过BCA蛋白定量实验对各洗涤液及洗脱液中的蛋白质含量进行测定(参见表2), 同时以PBS作为阴性对照。

[0062] 表2

[0063]		HEK293T	Lncap	BALL
	原液 (mg/ml)	2.145	2.512	2.758
	滤液 (mg/ml)	1.825	2.143	2.300
	洗涤液 (mg/ml)	0.212	0.220	0.312
	洗脱液 (mg/ml)	1.848	1.924	2.056

[0064] 通过BCA蛋白定量实验检测, 阴性对照PBS的蛋白浓度为0mg/ml, 由表2可知, 结合树脂与各细胞培养液样本中游离蛋白结合很少, 300μl 结合树脂可结合5ml 细胞培养液样本中蛋白质约0.3~0.5mg/ml, 说明样本中带正电荷蛋白质不与结合树脂结合, 即样本中游离蛋白质选择性与结合树脂结合。

[0065] 由表1和2可知, 样本中外泌体外膜上含有的蛋白质较游离蛋白质与结合树脂结合位点多, 结合较牢固, 洗涤液洗涤时可去除树脂上部分游离的蛋白质, 但外泌体几乎未丢失。

[0066] (8) Western Blot检测

[0067] 通过Western Blot实验对步骤(5)中洗脱后所得的外泌体溶液进行验证(参见图2)。

[0068] 用10% SDS-PAGE胶跑电泳:

[0069] ①10% SDS-PAGE分离胶的配制:

[0070]	成分	体积	单位
	H ₂ O	4	ml
	30% Acr/Bise	3.3	ml
	1.5M Tris-HCL pH8.8	2.5	ml
	10% SDS	100	μl
	10% AP	100	μl
	TEMED	10	μl

[0071] ②10% SDS-PAGE浓缩胶的配制:

[0072]	成分	体积	单位
	H ₂ O	1.53	ml
	30% Acr/Bise	0.33	ml
	0.5M Tris-HCL pH6.8	0.63	ml
	10% SDS	25	μl
	10% AP	30	μl
	TEMED	3	μl

[0073] 上样前处理:

[0074] 用BCA蛋白检测法分别对步骤(4)中的各洗脱液进行蛋白质定量: 检测得知BALL洗

脱液的蛋白质浓度为2.4mg/ml;HEK293T洗脱液的蛋白质浓度为3.1mg/ml;Lncap洗脱液的蛋白质浓度为2.9mg/ml。

[0075] 分别吸取步骤(4)中的各洗脱液20 μ l至0.5mL离心管中,加入5 $\times$ 上样缓冲液5 μ l至终浓度为1 $\times$,共25 μ l,上样前要将样品于99 $^{\circ}$ C加热10min使蛋白变性,待冷却至室温后,分别取20 μ l进行电泳上样。

[0076] 电泳时间一般1.5h左右,浓缩胶电压为80V恒压30min,分离胶电压为120V恒压40-50min。电泳至溴酚兰(接近20KDa)刚跑出即可终止电泳。

[0077] 转膜:使用PVDF膜进行湿转,250mM恒流转印1.5h。

[0078] 封闭:将PVDF膜浸泡在4%脱脂奶粉(TBST溶解)中,室温下脱色摇床上摇动封闭1h或4 $^{\circ}$ C过夜孵育。

[0079] 洗涤:TBST洗涤PVDF膜3次,8min/次。

[0080] 一抗孵育:一抗抗体CD9经4%BSA(TBST溶解)按1:500(v/v)稀释;CD63经4%BSA(TBST溶解)按1:1000(v/v)稀释;ALIX经4%BSA(TBST溶解)按1:400(v/v)稀释。室温孵育2h或4 $^{\circ}$ C过夜孵育。

[0081] 洗涤:TBST洗涤PVDF膜3次,8min/次。

[0082] 二抗孵育:二抗HRP标记的山羊抗鼠经4%脱脂奶粉(TBST溶解)按1:3000(v/v)稀释,室温孵育1h。

[0083] 洗涤:TBST洗涤PVDF膜3次,8min/次。

[0084] 显色:ECL发光显色,用凝胶成像系统分析目标带的分子量。

[0085] 结果如图2所示,从HEK293T/Lncap/BALL三种细胞培养液中分离和浓缩得到的外泌体经Western Blot验证,ALIX/CD9/CD63条带均清晰可见,并且条带很深。

[0086] (9)透射电镜(TEM)检测

[0087] 将外泌体取出5 μ L,稀释至10 μ L。吸取样品10 μ L滴加于铜网上孵育3min,滤纸吸去浮液,醋酸双氧铀10 μ L滴加于铜网上孵育1min,滤纸吸去浮液,常温干燥数分钟,100kv下电镜检测成像。三种培养液(HEK293T/Lncap/BALL)通过此方法获得的外泌体经电镜检测(参见图3),由图3-1HEK293T,图3-2Lncap,图3-3BALL可见各样本外泌体结构完整,呈茶托样。

[0088] (10)纳米粒径检测

[0089] 纳米粒子颗粒跟踪分析仪(NTA)检测方法:先用水稀释样本,颗粒浓度在 1×10^7 /mL和 1×10^9 /mL范围内。再采用Zeta View PMX110仪器在405nm激光测定样本中粒子数量和大小,以30张/秒拍摄照片,持续时间为1分钟。最后采用NTA软件(ZetaView8.02.28)分析颗粒的运动。

[0090] 通过此方法获得的外泌体经NTA检测(参见图4),由图4-1HEK293T,图4-2Lncap,图4-3BALL可见细胞培养液HEK293T获得的外泌体粒径为109.2nm的粒子数占98.7%,检测结果为 $9.6E+10$ particles/ml。细胞培养液Lncap获得的外泌体粒径为108.3nm的粒子数占98.4%,检测结果为 $9.4E+10$ particles/ml。细胞培养液BALL获得的外泌体粒径为123nm的粒子数占99%,检测结果为 $2.6E+10$ particles/ml。

[0091] 经上述实验鉴定,本发明对由DMEM和RPM1640两种常见培养基培养的各种细胞系中外泌体的分离和浓缩是可行的、有效的,保持外泌体的完整性和生物学功能。

[0092] 实施例2

[0093] 通过已建立的分离和浓缩外泌体的方法,进一步对人的尿液样本进行外泌体提取并鉴定。

[0094] (1) 取15ml人的尿液A和尿液B分别在4℃,3000g离心10min,去除细胞碎片及杂质,留上清液通过0.22μm孔径滤膜过滤去除较大的微囊泡,于2个10ml离心管中分别加入尿液A和尿液B各5ml(分别记作样品:尿液A、尿液B)。

[0095] (2) 移液器吸取500μl结合缓冲液加入到(1)中装有培养液的离心管中,盖紧盖子,颠倒混匀。其中,结合缓冲液为MOPES缓冲液时,MOPES浓度为15mM,乙酸钠浓度为20mM,EDTA浓度15mM,pH为8.3。

[0096] (3) 吸取200μl结合树脂加入到(2)中的离心管中,盖紧盖子,在室温下不间断的来回颠倒混匀,孵育15min,1500g离心2min,轻轻将离心管从离心机中取出,用移液器取500μl上清液(不要弃掉),小心倒掉剩余上清液,用移液器中的液体(500μl)轻轻吹起树脂,全部转移至纯化柱中(已放入收集管),静置2min,2,000g室温离心2min,弃去滤液及收集管。其中,结合树脂为以纤维素为基质,化学结构为 $-(CH_2)_2N^+(CH_3)_3$ 的阴离子交换树脂,可按照现有技术中记载制备获得,或是购自美国GE公司。

[0097] (4) 吸取500μl的洗涤液加入到纯化柱中,静置5min,2,000g室温离心2min,将滤液及收集管一并弃掉。其中,洗涤液为45mM Tris-HCl缓冲液,pH为7.02。

[0098] (5) 将纯化柱转移至低吸附蛋白的1.5ml离心管中,加入150μl的洗脱液,孵育5min,350g室温离心2min,将洗脱液重新转移至纯化柱中,孵育5min,2500g室温离心3min,离心管中所得液体即为浓缩后的外泌体溶液。其中,洗脱液为375mMNaCl,2.1mMKCl,6.8mMNa₂HPO₄,3.1mMKH₂PO₄的磷酸盐缓冲液,pH为7.0。

[0099] (6) 外泌体ELISA定量检测

[0100] 通过ELISA(人总外泌体捕获和定量试剂盒,产品编号RGEX0U96-1)实验对各样本中是否有外泌体存在进行验证(读数参见表3,结果图参见图5),同时以PBS作为阴性对照。

[0101] 表3

	尿液A	尿液B
原液(OD ₄₅₀ 值)	0.645	0.723
滤液(OD ₄₅₀ 值)	0.072	0.065
洗涤液(OD ₄₅₀ 值)	0.102	0.090
洗脱液(OD ₄₅₀ 值)	1.442	1.603

[0103] 通过ELISA实验检测,阴性对照OD₄₅₀为0.056,由表3可知,尿液样本A和B的滤液OD₄₅₀分别为0.072和0.065,其与阴性对照基本保持一致,即在5ml尿液样本中加入200μl结合树脂可将样本中外泌体几乎全部捕获。尿液样本A和B的洗涤液OD₄₅₀分别为0.102和0.090,说明洗涤时外泌体几乎未丢失。由图5可知,尿液样本A和B的洗脱液值明显高于原液,说明洗脱液中含有大量的外泌体,其相对于原液体积而言,外泌体可浓缩约25~30倍。

[0104] (7) BCA蛋白定量检测

[0105] 通过BCA蛋白定量实验对各洗涤液及洗脱液中的蛋白质含量进行测定(参见表4),同时以PBS作为阴性对照。

[0106] 表4

	尿液A	尿液B
--	-----	-----

原液(蛋白mg/ml)	9.432	8.789
滤液(蛋白mg/ml)	8.661	8.056
洗涤液(蛋白mg/ml)	0.421	0.526
洗脱液(蛋白mg/ml)	2.089	2.125

[0108] 通过BCA蛋白定量实验检测,阴性对照PBS的蛋白浓度为0mg/ml,由表4可知,结合树脂与尿液各样本中游离蛋白结合很少,200ul结合树脂可结合5ml尿液样本中蛋白质约0.5~0.8mg/ml,说明样本中带正电荷蛋白质不与结合树脂结合,即样本中游离蛋白质选择性与结合树脂结合。

[0109] 由表3和4可知,洗涤液洗涤时可去除树脂上部分游离的蛋白质,但外泌体几乎未丢失。

[0110] (8) Western Blot检测

[0111] 通过Western Blot实验对步骤(5)中洗脱后所得的外泌体溶液进行验证(参见图6)。

[0112] Western Blot实验方法及操作步骤同上。

[0113] 如图6所示,经Western Blot验证,尿液A和尿液B的ALIX/CD9/CD63条带均清晰可见,并且条带很深。

[0114] (9) 透射电镜(TEM)检测

[0115] 尿液A和尿液B通过此方法获得的外泌体,通过透射电镜(TEM)检测其结构(参见图7),操作方法同上,由图7-1尿液A,图7-2尿液B,各样本外泌体结构完整,呈茶托样。

[0116] (10) 纳米粒径检测

[0117] 尿液A和尿液B通过此方法获得的外泌体,通过纳米粒子颗粒跟踪分析仪(NTA)检测(参见图8),操作方法同上,图8-1尿液A,图8-2尿液B,分别可见尿液A获得的外泌体粒径为107.4nm的粒子数占97.1%,浓度为1.3E+10particles/ml。尿液B获得的外泌体粒径为107.5nm的粒子数占96.5%,浓度为1.3E+10particles/ml。

[0118] 经上述实验鉴定,本发明对尿液中外泌体的分离和浓缩也是可行的、有效的,保持外泌体的完整性和生物学功能。

[0119] 以上所述仅是本发明的具体实施方式,使本领域技术人员能够理解或实现本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

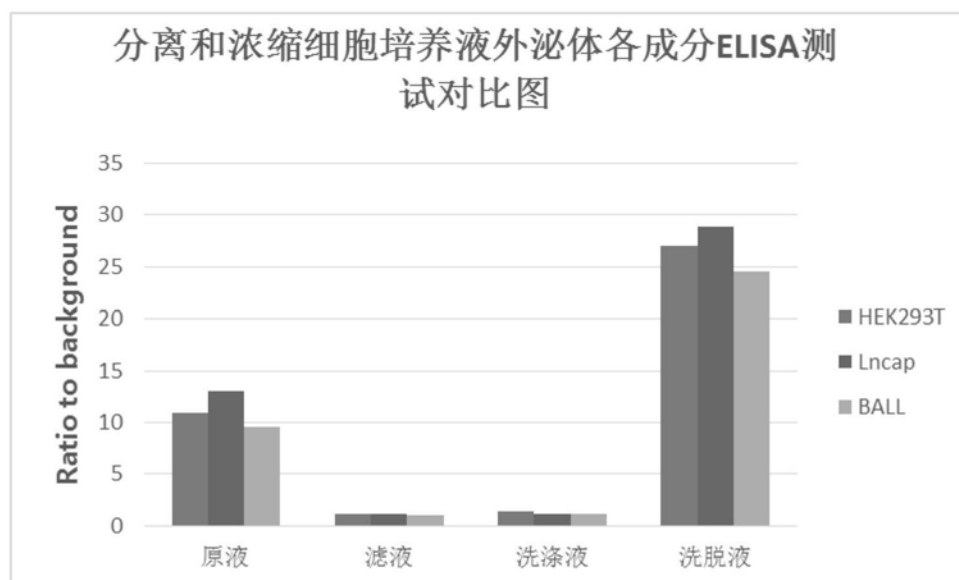


图1

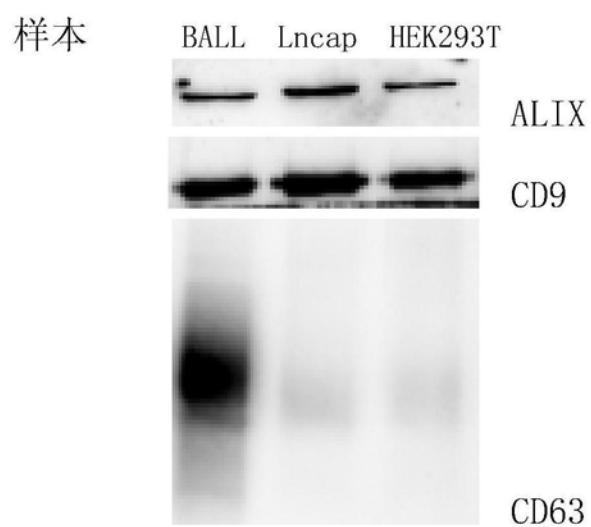


图2

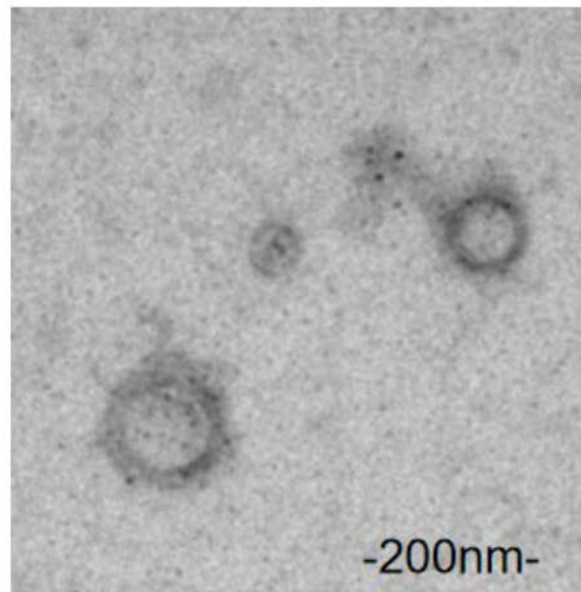


图3-1

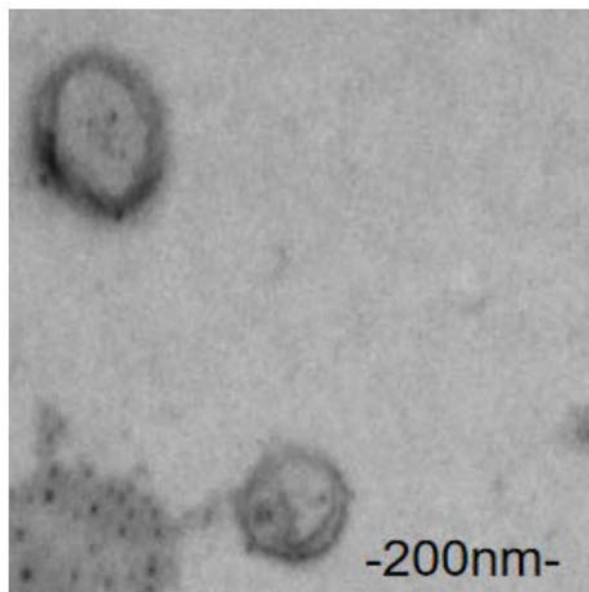


图3-2

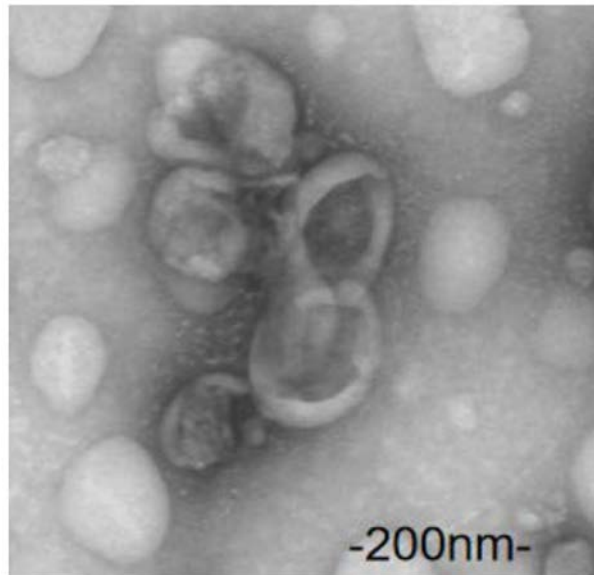


图3-3

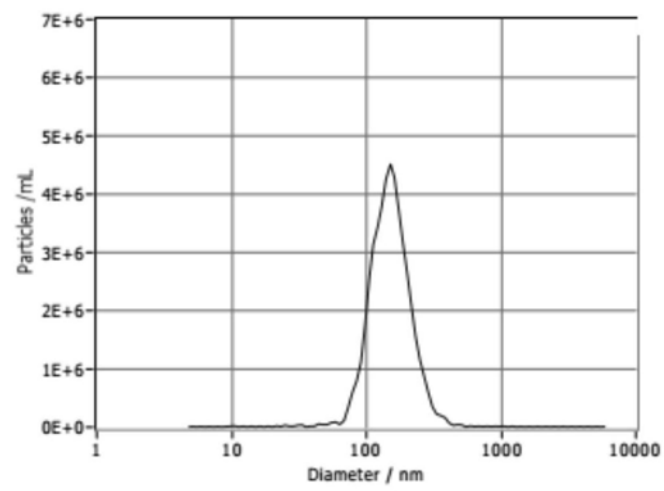


图4-1

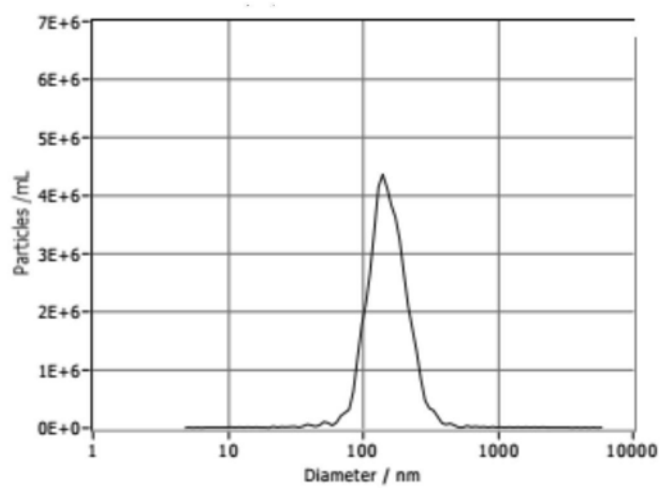


图4-2

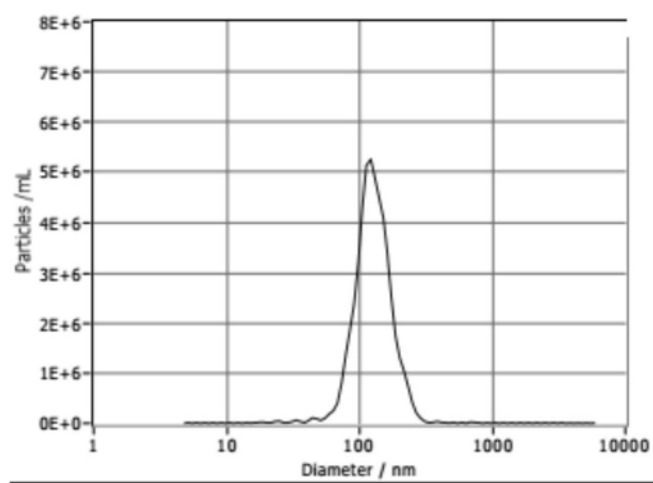


图4-3

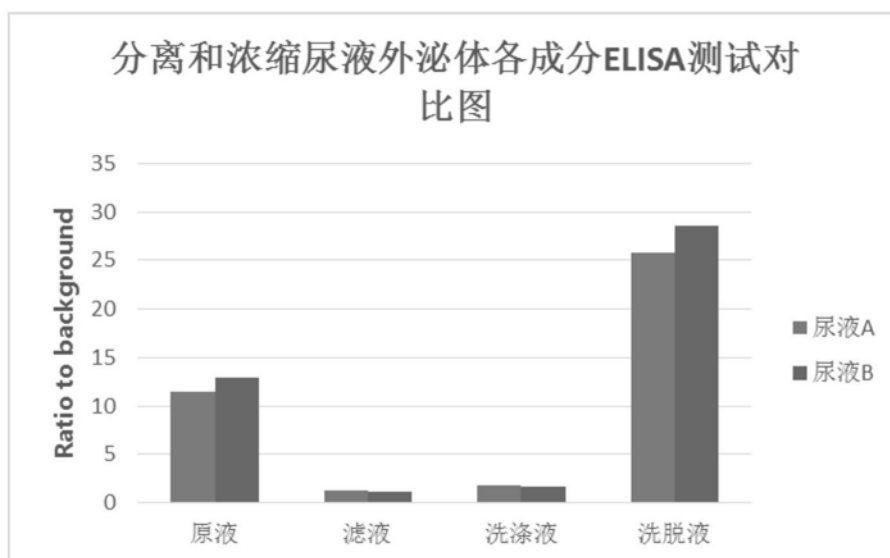


图5

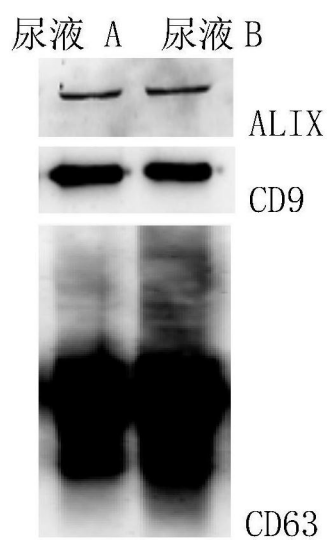


图6

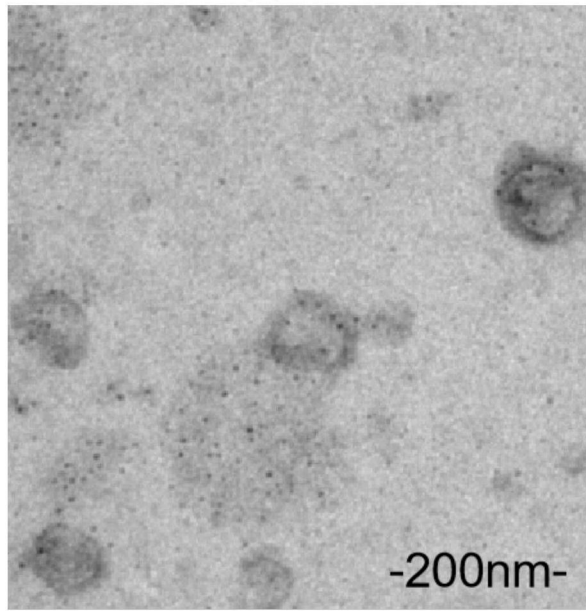


图7-1

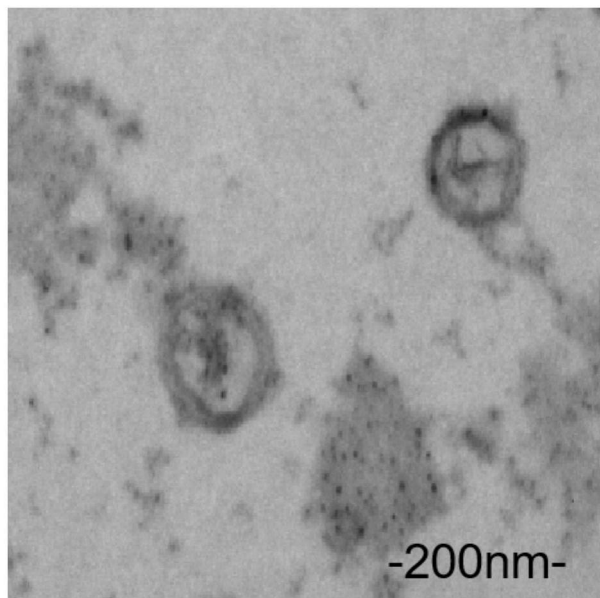


图7-2

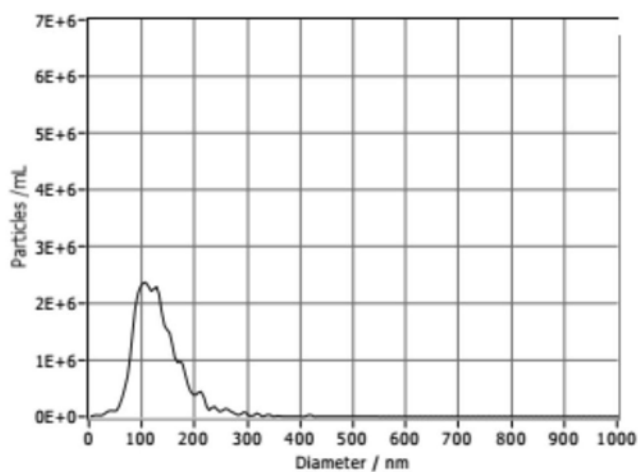


图8-1

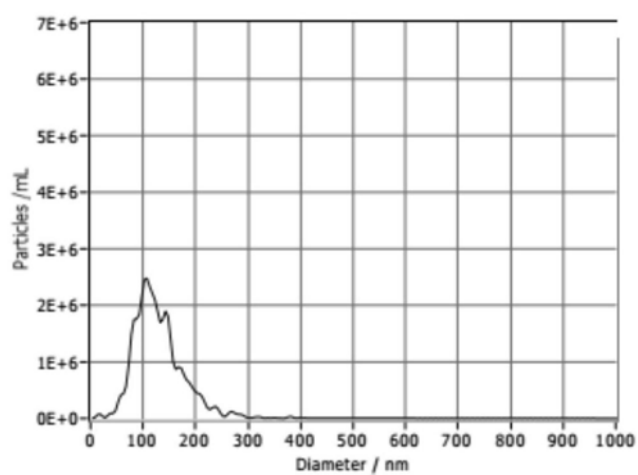


图8-2