



(10) 授权公告号 CN 113631240 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 08

(21) 申请号 202080024409.0

(22) 申请日 2020.02.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113631240 A

(43) 申请公布日 2021.11.09

(30) 优先权数据
10-2019-0017053 2019.02.14 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.09.26

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2020/001987 2020.02.12

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/166978 KO 2020.08.20

(73) 专利权人 高丽大学校算学协力团
地址 韩国首尔

(72) 发明人 申世铉 李灏润 罗元徽 金珍现

(74) 专利代理机构 北京金宏来专利代理事务所
(特殊普通合伙) 11641
专利代理师 刘慧红

(51) Int.Cl.
B01D 37/03 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
B01D 21/01 (2006.01)

(56) 对比文件
Maria Yu. Konoshenko等.Isolation of
Extracellular Vesicles: General
Methodologies and Latest Trends.2018,第
2018卷第1-27页.

审查员 金律

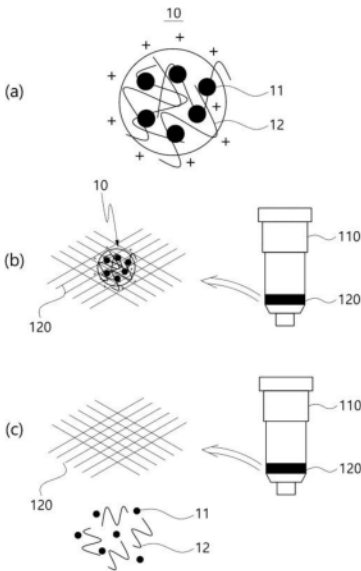
权利要求书1页 说明书10页 附图11页

(54) 发明名称

从生物样品中提取微泡的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种从生物样品中提取微泡的方法,所述方法包括以下步骤:将多价阳离子材料加入所述生物样品以形成聚集体,其中所述微泡和所述多价阳离子材料通过电荷力聚集;当包括所述聚集体的所述生物样品通过捕获滤器时通过所述捕获滤器捕获所述聚集体;和通过允许洗脱液通过其中捕获有所述聚集体的所述捕获滤器提取所述微泡,以从所述聚集体中分离所述微泡。因此,可以在没有离心过程的情况下使用多价阳离子材料提取微泡。



1. 一种从生物样品中提取微泡的方法,所述方法包括:

将多价阳离子物质加入所述生物样品以形成多个聚集体,其中所述微泡和所述多价阳离子物质彼此通过电荷力聚集;

将包含所述聚集体的所述生物样品通过捕获滤器,同时通过所述捕获滤器捕获所述聚集体;

将具有负电荷的缓冲溶液通过其中捕获有所述聚集体的所述捕获滤器,从而从所述捕获滤器中释放所述聚集体;和

将洗脱液注入从所述捕获滤器释放的所述聚集体,从而从所述聚集体中分离所述微泡,然后提取分离的微泡,

其中所述生物样品包括血液、血浆、血清、尿、唾液、脑脊髓液、眼泪、汗液、粪便、腹水、羊水、精液、乳汁、细胞培养基、组织提取物或癌组织,

其中,所述微泡包括外泌体、阿尔戈体、核外颗粒体、外囊泡、癌小体、前体、前列腺小体、耐受体、微粒、纳米泡囊、起泡泡囊、出芽泡囊、外泌体状泡囊、基质泡囊、膜泡囊、脱落泡囊、膜颗粒、脱落微泡、膜泡、附睾体、凸素体或古细菌脂质体中的任一种以上,其中,所述外泌体包括树突状细胞源体和肿瘤细胞源体,

其中所述多价阳离子物质包括聚赖氨酸、聚精氨酸、聚组氨酸、鱼精蛋白、阳离子葡聚糖、阳离子树枝状聚合物、阳离子多糖、聚酰胺基胺、聚乙烯亚胺、聚季铵盐或其组合,

其中所述洗脱液含有离液剂或蛋白酶。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述离液剂包括盐、正丁醇、乙醇、高氯酸锂、乙酸锂、氯化镁、苯酚、2-丙醇、十二烷基硫酸钠、硫脲、脲或其组合,所述盐包括胍离子。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述蛋白酶包括蛋白酶K、胃蛋白酶、胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述捕获滤器由亲水性材料或阳离子交换树脂制成,使得所述聚集体通过电荷力被捕获在所述捕获滤器中,

其中所述缓冲溶液含有以下中至少之一: Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 NH_4^{+} 离子,或其组合。

从生物样品中提取微泡的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种从生物样品中提取微泡的方法。更具体地,本发明涉及一种从生物样品中提取微泡的方法,其中所述方法可以在没有离心过程的情况下使用多价阳离子物质提取微泡。

背景技术

[0002] 体内微泡是指存在于各种类型的细胞中或者从细胞分泌的具有膜结构的小泡囊。从细胞中分泌出来的微泡包括外泌体、脱落的微泡(SMV)和凋亡小泡。在这方面,外泌体是直径为30~100nm的膜状泡囊并且来源于吞噬细胞;脱落微泡是直径50~1000nm的大膜状泡囊,其直接从质膜上脱落。凋亡小泡是指从死亡细胞上脱落的直径为50~5000nm的泡囊。

[0003] 这种体内微泡,例如外泌体,是从细胞分泌的数十纳米大小泡囊,并且具有这样的结构,其中在细胞质或细胞中产生的蛋白和RNA被包含在脂双层或脂单层中。

[0004] 通过交换蛋白和RNA,外泌体用作细胞之间的通讯的工具,并且负责排出细胞内不需要的物质。外泌体含有微小RNA(miRNA)并且因此预期用作分子诊断的有用标记物,所述分子诊断诸如疾病如癌症的早期诊断。

[0005] 然而,尽管如上所述已经揭示了体内微泡的重要性和价值,但是在提取微泡方面仍然存在许多困难,因为它们具有纳米量级非常小的尺寸。

[0006] 分离微泡的常规技术包括超速离心分离、大小排阻、免疫亲和分离、微流控芯片和聚合方法。

[0007] 在以上常规方法中,超速离心分离法是最广泛使用的分离微泡的方法,并且被认为是最可靠的方法以及其自身具有简单的原理。

[0008] 然而,在使用超速离心分离法分离微泡中,微泡的收率低。分离微泡花费许多时间,例如8小时或以上。

[0009] 此外,在超速离心分离法中,应当使用可以以100,000至200,000RPMs旋转的离心机。当普通实验室中使用的离心机以5,000至10,000RPMs旋转时,在超速离心分离法中必须使用昂贵的离心机。

[0010] 大小排阻法主要与超速离心分离法一起使用,并且具有提高微泡纯度的优势。由于微泡粘附到滤器上的现象,导致大小排阻法中收率降低。大小排阻法应当与超速离心分离法一起使用。

[0011] 免疫亲和分离法意欲通过将抗体附着至微泡来分离微泡。免疫亲和分离法以非常高的选择性分离特定的微泡。然而,提取效率低,因为没有广泛适用于普遍微泡的抗体。此外,由于抗体制备过程花费时间长并且成本高,所以免疫亲和分离法不适用于实际诊断。

[0012] 此外,在使用聚合物的聚合方法中,通过将PEG(聚乙二醇)添加到样品以降低其溶解度,将微泡沉淀下来。在该方法中,使用离心分离器可以改善沉淀效率。然而,检查成本高,因为使用了离心分离器。沉淀物的纯度降低,因为诸如EV的杂质一起沉淀下来。该方法不适合用于诊断。

发明内容

[0013] 技术目的

[0014] 因此,设计了本发明以解决上述问题。因此,本发明的一个目的是提供一种从生物样品中提取微泡的方法,其中所述方法可以在没有离心过程的情况下使用多价阳离子物质提取微泡。

[0015] 技术方案

[0016] 上述目的是通过根据本发明的从生物样品中提取微泡的方法实现的,所述方法包括:将多价阳离子物质加入所述生物样品以形成聚集体,其中所述微泡和所述多价阳离子物质彼此通过电荷力(electrical force)聚集;将包含所述聚集体的所述生物样品通过捕获滤器,同时通过所述捕获滤器捕获所述聚集体;和将洗脱液通过其中捕获有所述聚集体的所述捕获滤器,从而从所述聚集体中分离所述微泡,然后提取分离的微泡。

[0017] 此外,上述目的是通过根据本发明的从生物样品中提取微泡的方法实现的,所述方法包括:将多价阳离子物质加入所述生物样品以形成聚集体,其中所述微泡和所述多价阳离子物质彼此通过电荷力聚集;将包含所述聚集体的所述生物样品通过捕获滤器,同时通过所述捕获滤器捕获所述聚集体;将具有负电荷的缓冲溶液通过其中捕获有所述聚集体的所述捕获滤器,从而从所述捕获滤器中释放所述聚集体;和将洗脱液注入从所述捕获滤器释放的所述聚集体,从而从所述聚集体中分离所述微泡,然后提取分离的微泡。

[0018] 在这方面,多价阳离子物质可以包括聚赖氨酸、聚精氨酸、聚组氨酸、鱼精蛋白、阳离子葡聚糖、阳离子树枝状聚合物、阳离子多糖、聚酰胺基胺(poly amidoamine)、聚乙烯亚胺、聚季铵盐或其组合。

[0019] 此外,洗脱液可以含有离液剂或蛋白酶。

[0020] 生物样品可以包括血液、血浆、血清、尿、唾液、脑脊髓液、眼泪、汗液、粪便、腹水、羊水、精液、乳汁、细胞培养基、组织提取物或癌组织。

[0021] 离液剂可以包括盐(包括胍离子)、正丁醇、乙醇、高氯酸锂、乙酸锂、氯化镁、苯酚、2-丙醇、十二烷基硫酸钠、硫脲、脲或其组合。

[0022] 此外,蛋白酶可以包括蛋白酶K、胃蛋白酶、胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶。

[0023] 此外,捕获滤器可以具有能够捕获所述聚集体的尺寸的孔隙。

[0024] 在这方面,捕获滤器可以包括以下中至少之一:具有其中限定有孔隙的膜;或珠填充(bead packing)过滤器,其中多个微珠以3维方式紧密填充从而在其中形成孔隙。

[0025] 此外,捕获滤器可以由亲水性材料或阳离子交换树脂制成。

[0026] 此外,捕获滤器可以由亲水性材料或阳离子交换树脂制成,使得所述聚集体通过电荷力被捕获在所述捕获滤器中,其中所述缓冲溶液含有以下中至少之一: Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 NH_4^{+} 离子,或其组合。

[0027] 技术效果

[0028] 根据本发明,可以实现一种从生物样品中提取微泡的方法,其中所述方法可以在没有离心过程的情况下使用多价阳离子物质提取微泡。

附图说明

[0029] 图1是阐述根据本发明的从生物样品中提取微泡的方法的图表。

- [0030] 图2至图4是阐述根据本发明的从生物样品中提取微泡的方法的实施方案的图表。
- [0031] 图5显示根据本发明的微泡提取方法产生的微泡聚集体和分离的微泡的大小和形状。
- [0032] 图6显示通过本文的本发明实施例和比较例提取的微泡的大小和形状。
- [0033] 图7显示测量微泡中的蛋白标记物和RNA的结果,所述微泡根据本发明实施例和比较例提取。
- [0034] 图8显示对于生物样品中组分的 ζ 电势测量结果。
- [0035] 图9显示根据多价阳离子物质浓度的微泡聚集体形成结果。
- [0036] 图10显示根据温育时间和温育温度的微泡聚集体形成结果。
- [0037] 图11显示基于洗脱液中离液剂的浓度的微泡的尺寸和收率。
- [0038] 图12显示基于洗涤液中离液剂的浓度的蛋白杂质的量和微泡的量。
- [0039] 图13显示基于洗脱液中蛋白酶的量的微泡聚集体的分离量。

具体实施方式

[0040] 以下,参考附图将详细描述根据本发明的实施方案。

[0041] 根据本发明,术语“微泡”与从古细菌、原核生物或真核生物的细胞膜释放的细胞外泡囊同义使用。根据本发明,微泡可以包括外泌体(exosomes)、阿尔戈体(argosome)、核外颗粒体(ectosomes)、外囊泡(exovesicle)、癌小体(oncosome)、前体(prominosome)、前列腺小体(prostasome)、耐受体(tolerosome)、微粒、纳米泡囊、起泡泡囊、出芽泡囊、外泌体状泡囊、基质泡囊、膜泡囊、脱落泡囊、膜颗粒、脱落微泡、膜泡、附睾体(epididimosome)、凸素体(promininosome)或古细菌脂质体(archeosome),但可以不限于此,其中外泌体包括树突状细胞源体(dexosomes)和肿瘤细胞源体(texosome)。

[0042] 图1是阐述根据本发明的从生物样品中提取微泡的方法的图表。图2是显示根据本发明的从生物样品中提取微泡的方法的实施方案的图表。

[0043] 参考图1和图2,根据本发明的用于提取微泡的方法可以包括将多价阳离子物质12加入含有微泡11的生物样品(S10)。根据本发明,生物样品可以包括含有微泡的细胞培养液、组织样品等。具体地,生物样品可以包括动物、植物或微生物来源的细胞培养基、组织提取物、癌组织、血液、血浆、血清、尿、唾液、脑脊髓液、眼泪、汗液、粪便、腹水、羊水、精液或乳汁,但是可以不限于此。

[0044] 微泡11具有负电(-)性质。因此,当将多价阳离子物质12加入生物样品时,多价阳离子物质12和微泡11彼此通过电荷力聚集,由此形成聚集体10,如图2的(a)中所示(S11)。

[0045] 根据本发明,多价阳离子物质包括阳离子。特别地,多价阳离子物质可以包括聚赖氨酸(其可以以盐形式诸如聚-L-赖氨酸氢溴酸盐或聚-L-赖氨酸盐酸盐获得)、聚精氨酸、聚组氨酸、鱼精蛋白(其可以以盐形式诸如鱼精蛋白盐酸盐或鱼精蛋白硫酸盐获得)、阳离子葡聚糖、阳离子树枝状聚合物、阳离子多糖、聚酰胺基胺、聚乙烯亚胺、聚季铵盐或其组合。然而,本发明不限于此。在一个实施方案中,多价阳离子物质可以是聚赖氨酸盐。

[0046] 在本发明的一个实施方案中,多价阳离子物质采用浓度为0.02至2.00mg/mL、分子量为150至300kD的聚-L-赖氨酸(PLL)(本发明实施例1)。

[0047] 如上所述,每个微泡11的尺寸在纳米范围内。因此,难以提取微泡11。根据本发明,

具有负电(-)性质的微泡11与多价阳离子物质12通过电荷力聚集而形成具有增加的尺寸的聚集体,其可以被容易地捕获。

[0048] 在这方面,在特定温度条件下多价阳离子物质12和微泡11之间的聚集的温育过程进行特定时间段。

[0049] 在一个实施方案中,温育过程可以在0.1至40℃的温度条件下,优选在低于25℃下进行。例如,温育过程可以在低于20℃、或低于15℃、或低于12℃、或低于10℃的温度下进行。例如,该过程可以在1至8℃的温度条件下进行。

[0050] 在一个实施方案中,温育过程可以进行0.5至100分钟,优选少于30分钟的持续时间。例如,温育过程可以进行少于25分钟、或少于20分钟、或少于15分钟的持续时间。例如,该过程可以进行5至15分钟。

[0051] 在本发明的一个实施方案中,确定了当温育过程在4℃进行10分钟时微泡聚集体有效地形成(图10)。

[0052] 在这方面,用于聚集的温育持续时间可以实验确定。与常规免疫亲和分离法所需的时间相比,使用电荷力聚集所需的时间可以显著减少。

[0053] 根据本发明,多价阳离子物质12采用聚赖氨酸盐、聚精氨酸、聚组氨酸盐、鱼精蛋白盐酸盐、鱼精蛋白硫酸盐、阳离子葡聚糖、阳离子树枝状聚合物、阳离子多糖、聚酰胺基胺、聚乙烯亚胺或聚季铵盐、或其组合。

[0054] 如上所述,多价阳离子物质12和生物样品中的微泡11彼此聚集而形成聚集体10。因此,当生物样品通过捕获滤器120时,聚集体10可以被捕获滤器120捕获(S12)。

[0055] 根据本发明,如图2的(b)中所示,例如通过重力或负压,生物样品通过安装在提取管110内部的捕获滤器120。

[0056] 此外,在图2中所示的实施方案中,捕获滤器120的孔隙尺寸能够捕获聚集体10。例如,捕获滤器120可以具体化为其中形成孔隙的膜或者其中多个微珠以3D方式紧密填充从而形成孔隙的珠填充过滤器。

[0057] 捕获滤器可以具有能够捕获其中的微泡聚集体的孔隙尺寸。捕获滤器中形成的孔隙尺寸可以设置为其中微泡聚集体不能从捕获滤器中逃脱的尺寸。此外,孔隙可以具有这样的尺寸,使得当聚集体在随后的洗脱步骤中被洗脱液解聚时,分离的微泡可以流过孔隙。在一个实施方案中,捕获滤器中孔隙尺寸可以在50nm至1000nm、特别是100nm至500nm和更特别地150nm至300nm范围内。

[0058] 与微泡聚集体接触的捕获滤器的表面部分可以具体化为膜、珠、柱、或其组合。在一个实施方案中,捕获滤器可以以形成孔隙的膜或其中多个微珠彼此紧密填充从而形成孔隙的珠填充过滤器的形式提供。

[0059] 在这方面,捕获滤器120可以由亲水性材料或阳离子交换树脂制成,使得具有正电子特性的聚集体10更容易被捕获其中。

[0060] 当捕获滤器由亲水性材料制成时,微泡聚集体可以容易地被捕获在孔隙中和被物理捕获。亲水性材料可以包括银金属、聚醚砜、玻璃纤维、聚碳酸酯径迹蚀刻(polycarbonate track etch, PCTE)、聚酯、混合纤维素酯(MCE)、尼龙、醋酸纤维素或其组合。

[0061] 当捕获滤器由阳离子交换树脂制成时,微泡聚集体通过电荷力被吸附在带负电的

捕获滤器的滤器表面上。阳离子交换树脂可以包括羧甲基、甲基磺酸酯、磺酰基或其组合。

[0062] 图3的(b)中所示的实施方案显示了由具有负电荷的阳离子交换树脂制成的捕获滤器120a的一个实例,其可以使用电荷力捕获聚集体10。

[0063] 即,根据本发明,可以采用:其中聚集体10被其中形成孔隙的捕获滤器120捕获的方式,和/或其中聚集体10被由具有负电荷的阳离子交换树脂制成的捕获滤器120通过电荷力捕获的方式。因此,纳米等级的微泡11可以与多价阳离子物质12聚集以形成聚集体10,所述聚集体10可以容易地被捕获在孔隙中或者使用电荷力容易地捕获。

[0064] 在本发明的实施方案中,使用孔隙大小为大约220nm的注射器滤器,过滤微泡聚集体(本发明实施例1)。

[0065] 如上所述,当捕获滤器120捕获聚集体10时,使用洗脱液进行微泡11的提取过程S13和S14。在这方面,根据本发明,在使用洗脱液进行微泡11的提取过程之前,洗涤溶液可以通过捕获滤器120以洗涤捕获滤器120。这可以去除除聚集体10以外的在微泡11上收集的残余物诸如EVs。因此,可以提高最终提取的微泡11的纯度。

[0066] 根据本发明,洗涤溶液可以含有稍后描述的离液剂。在此情形中,洗涤溶液中含有的离液剂优选含有的浓度低于洗脱液中含有的离液剂的浓度。例如,当洗脱液含有包括胍离子的盐作为离液剂时,洗涤溶液也可以含有包括胍离子的盐作为离液剂。在此情形中,洗涤溶液中含有的离液剂的浓度低于洗脱液中含有的离液剂的浓度。例如,前者可以在0.1至4.5M、0.5至4M和1至3M范围内。在本发明的一个实施方案中,使用含有0至2M浓度的硫氰酸胍的洗涤溶液洗涤捕获的微泡聚集体(图12)。

[0067] 洗涤溶液可以含有适当的盐以有效地洗涤杂质。在一个实施方案中,所述盐可以含有单价阳离子诸如 NH_4^+ 、 Na^+ 和 K^+ ,二价阳离子诸如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ,或其组合。例如,洗涤溶液中的盐可以是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2SO_4 、 NaCl 、 KCl 、 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 或其组合。所述盐可以以低于某个浓度(例如低于10mM)的浓度包含在洗涤溶液中。

[0068] 当洗涤过程完成时,洗脱液可以通过捕获滤器120(S13),其中捕获聚集体10以从聚集体10中分离微泡11,并且可以提取微泡11(S14)。

[0069] 根据本发明,洗脱液可以含有离液剂(Chaotropic agent)或蛋白酶(Protease)。

[0070] 根据本发明,离液剂是指将水溶液中的水分子的货物结构(cargo structure)去稳定化或破坏的物质或离子。由于将离液剂加入水溶液,水的熵增加而影响蛋白之间的力、氢键、范德华力或疏水键。因此,其分子结构被去稳定化。

[0071] 所述离液剂可以包括包含胍离子的盐,诸如异硫氰酸胍、硫氰酸胍、氯化胍、或盐酸胍;正丁醇、乙醇、高氯酸锂、乙酸锂、氯化镁、苯酚、2-丙醇、十二烷基硫酸钠、硫脲、脲或其组合,但可以不限于此。

[0072] 在一个实施方案中,根据本发明的离液剂包括硫氰酸胍(GuTc),其可以以1至9M、特别是2至8M、更特别地3至7M或4至6M的浓度被包含在洗脱液中。

[0073] 蛋白酶可以包括蛋白酶K、胃蛋白酶、胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶。

[0074] 上述洗脱液可以去除构成聚集体10的微泡11和多价阳离子之间的电子键,以从聚集体10分离微泡11,由此使得能够提取微泡11。即,使用洗脱液从聚集体10分离微泡11可以允许消除用于提取微泡11的离心过程。因此,与使用离心分离器的常规方法相比,微泡11可以以较低成本和较少的持续时间提取。

[0075] 在一个实施例中,图4是显示根据本发明的从生物样品中提取微泡的方法的另一个实施方案的图表。在图4所示的实施方案中,如图4的(b)中所示,捕获滤器120a由亲水性材料或阳离子交换树脂制成。因此,聚集体10被捕获滤器120a使用电荷力捕获。

[0076] 此外,当捕获步骤和洗涤步骤如在上述实施方案中完成时,具有负电荷的缓冲溶液可以通过其中捕获有聚集体10的捕获滤器120a,使得聚集体10从捕获滤器120a释放,如图4的(c)中所示。然后,洗脱液可以被注射到如在上述实施方案中从捕获滤器120a上分离的聚集体10中,使得微泡11从聚集体10分离,以提取微泡11。根据本发明,缓冲溶液可以含有例如以下中至少之一:Ca²⁺、Mg²⁺、Na⁺、K⁺、NH⁴⁺离子,或其组合。

[0077] 图5至图13是阐述根据本发明的从生物样品中提取微泡11的方法的实验实施例的图表。该实验实施例使用血浆作为生物样品。在该实验实施例中,将聚-L-赖氨酸溶液用作多价阳离子物质12。微泡11和多价阳离子物质12彼此聚集以形成聚集体10。该实验实施例将在下面描述。

[0078] 图5显示了与根据一个实施方案的微泡11的尺寸相比,聚集体10的尺寸显著增加。

[0079] 图6显示了与现有技术中使用的比较例方法相比,使用根据本发明的实施方案的方法的微泡11的提取收率和纯度得到提高。

[0080] 图7显示了胞外泡囊(EVs)的生物标记物在根据本发明的实施方案提取的微泡11中良好表达,并且因此有效地用于分析,诸如随后的分子诊断。

[0081] 基于图9,鉴定了当分别加入0、0.10mg/mL、0.25mg/mL、0.50mg/mL、1.0mg/mL、5.0mg/mL的多价阳离子物质12时,在底部上形成了聚集体10。

[0082] 图10显示了形成微泡11的聚集体10所需的最适温度和时间。

[0083] 图13显示了关于在将聚-L-赖氨酸溶液加入血浆以形成聚集体10和然后向其加入蛋白酶K作为洗脱液之后,聚集体10是否降解和重悬浮的实验的结果。在该实验中,加入0.25mg/mL的聚-L-赖氨酸溶液和例如100μl、200μl和300μl的蛋白酶K。如图13所示,确定了聚集体10被降解和重悬浮。

[0084] 图11中的(a)显示了关于在将聚-L-赖氨酸溶液加入血浆以形成聚集体10和然后向其加入硫氰酸胍溶液作为洗脱液之后,聚集体10是否降解和重悬浮的实验的结果。图11中的(a)从左至右,加入蒸馏水、1M、2M、3M和4M硫氰酸胍溶液。可以看到,聚集体的重悬浮水平随着溶液浓度增加而提高。

[0085] 图11中的(b)是显示了使用纳米颗粒跟踪分析装置,检查图11中(a)的重悬浮溶液中粒子尺寸的结果的图表。如图11的(b)中所示,可以看到,随着溶液浓度增加,聚集体10被重悬浮,因此粒径随着浓度增加而降低。在图11的(c)中,可以看到含有图11中(a)的重悬浮聚集体的溶液的浓度随着硫氰酸胍溶液的浓度增加而增加。

[0086] 图12显示了基于洗涤溶液中离液剂GuTc的浓度,蛋白杂质和微泡的测量。基于图12证实了使用浓度为2M的GuTc有效地进行了洗涤过程。

[0087] 实施例

[0088] 以下,基于实施例将更详细地描述本发明。这些实施例仅仅为了阐述本发明,并且对于本领域普通技术人员明显的是,本发明的范围不应理解为被这些实施例限制。

[0089] 生物样品的制备

[0090] 在获得高丽大学安南医院学院审查委员会(IRB项目编号:2016AN0090)和所有血

液样品申请人的同意后,进行本研究。血液样本取自每位申请人的肘正中静脉,并收集在3mL K2-EDTA真空采血管(Becton Dickinson,USA)中。全血以1900g离心10分钟,然后以12,000g离心15分钟以分离血浆。然后,将血浆通过孔径为800nm的筛网过滤以去除大碎片。制备每个1mL的血浆样品。

[0091] 本发明实施例1.通过使用阳离子聚合物聚集和使用离液剂洗脱来分离胞外泡囊

[0092] 将阳离子聚合物加入制备的血浆样品中以诱导胞外泡囊和聚合物之间通过电荷之间的相互作用的聚集。形成具有数百纳米的尺寸的聚集体。将具有150至300kDa分子量的聚-L-赖氨酸(PLL,Sigma-Aldrich,USA)用作阳离子聚合物。在制备浓度为10mg/mL的PLL储液后,我们另外向其中加入储液,使得调整每个血浆样品中的最终PLL浓度(0.02至2.00mg/mL)。我们仔细考虑了分离的胞外泡囊的收率和纯度,然后调整最终PLL浓度为0.5mg/mL。将血浆和PLL溶液的混合物在4℃温育10分钟。在温育后,使用孔径为220nm的注射器滤器过滤混合物。在过滤后,大的聚集颗粒留在滤器中。

[0093] 为了从具有PLL的聚集体中获得胞外泡囊,将2mL的洗涤缓冲液(GuTc,2M)和200μL的洗脱缓冲液(GuTc,5M)用于相同筛网上。通过让洗涤缓冲液流至聚集蛋白来进行洗涤。然后,使用GuTc溶液分离胞外泡囊,并且从中去除PLL聚合物和血浆蛋白。

[0094] 为了鉴定获得的胞外泡囊,对SEM图像(Quanta 250FEG;FEI,USA)照相和分析。

[0095] 比较例1.使用超速离心分离胞外泡囊

[0096] 超速离心(UC)法是传统广泛用于分离胞外泡囊的标准方法。尽管UC分离法方案是简单的,但是它耗时(超过6小时)和具有劳动密集型的缺点。血浆和PBS彼此以1:1比率混合。将混合物离心以去除残余的细胞组分(4℃,12,000g,30min)。将上清液转移并且在其上在相同条件下重复离心一次。将上清液使用孔径为200μm的注射器滤器(Merck Millipore,USA)过滤,接着在120,000g和4℃下超速离心2小时(CP100WX;日立,日本)。在抽吸上清液后,将底部沉淀小心用PBS于120,000g和4℃洗涤1小时,然后重悬浮于50μL的PBS中。

[0097] 比较例2.使用诱导胞外泡囊沉淀的商业化的PEG溶液分离胞外泡囊

[0098] 使用ExoQuick™外泌体沉淀溶液(EXOQ5A-1,System Biosciences,USA),其为商业化用于胞外泡囊分离的代表性产品。标准方案可以参照ExoQuick用户手册。

[0099] 简而言之,将血浆样品与作为基于PEG的溶液的ExoQuick溶液混合,然后将混合物在4℃温育30分钟。在温育后,将混合物于1,500g离心30分钟。将上清液小心抽吸,留下沉淀于底部。于1,500g进行进一步的离心5分钟,然后完全去除ExoQuick溶液。然后将剩余的沉淀重悬浮于200μL的PBS中。

[0100] 比较例3.使用商业化的旋转(spin)柱的胞外泡囊分离

[0101] 作为另一种胞外泡囊分离方法,进行使用商业化旋转柱型胞外泡囊分离试剂盒的exoEasy™法,所述试剂盒利用膜和胞外泡囊之间的电相互作用。

[0102] 实验实施例1.测量微泡聚集体的粒径

[0103] 使用动态光散射法(DLS)测量根据本发明实施例1的粒径。结果,确定了胞外泡囊聚集体(600nm)具有比胞外泡囊(200nm)显著更大的尺寸。结果表明胞外泡囊与PLL聚集。还使用SEM将分离的胞外泡囊和与PLL聚集的胞外泡囊可视化。在聚集的胞外泡囊中,胞外泡囊完全被聚合物围绕。胞外泡囊的尺寸和胞外泡囊聚集体的尺寸分别确定为171nm和815nm(图5)。

[0104] 实验实施例2. 基于微泡提取方法的类型的微泡尺寸之间的比较

[0105] 将通过应用本发明实施例1的方法从血浆中分离的胞外泡囊的收率、尺寸和纯度与比较例1、2和3进行比较。比较例2是基于用于胞外泡囊的基于聚合物(PEG)的沉淀和分离法,并且比较例3是基于使用旋转柱类型的胞外泡囊分离试剂盒的方法,所述试剂盒利用胞外泡囊和膜之间的电相互作用。基于纳米颗粒跟踪分析(NTA) (Malvern Panalytical, USA) 测量胞外泡囊的尺寸分布。使用低温-TEM(TecnaiG2-F20, FEI, USA) 鉴定其形状和大小。

[0106] 基于SEM测量的结果,使用比较例1分离的胞外泡囊具有大约20至130nm的尺寸分布,而基于SEM测量的结果,使用ExoCAs分离的胞外泡囊具有30至100nm的尺寸分布(图6中的(d)和(e))。

[0107] 此外,将根据本发明实施例1分离的胞外泡囊的TEM图像形态与使用比较例1分离的胞外泡囊进行比较。结果,在两种方法中,在直径为100至200nm的泡囊中观察到清晰的形态(图6中的(d)和(e))。此外,在比较例1和本发明实施例1的TEM图像之间没有发现显著差别。

[0108] 在分析胞外泡囊回收方面,确定了比较例2和本发明实施例1两种方法分别具有 41×10^{10} /mL和 61×10^{10} /mL的高收率,而比较例1和比较例3的方法分别具有 3.8×10^{10} /mL和 9×10^{10} /mL的较低收率。确定了本发明实施例1具有比比较例1和3中每个的胞外泡囊收率高6-17倍的胞外泡囊收率(图6中的(b))。

[0109] 在用于评估胞外泡囊分离性能的参数之中,决定随后分析的质量的蛋白污染也是重要的。即,洗脱缓冲液中的蛋白量应当最小化,而其中的胞外泡囊应当以高浓度浓缩。根据BCA蛋白测定法(#23225; Thermo Scientific, USA),测量了基于不同胞外泡囊分离法的蛋白污染水平。测试样品是如在每种方法中获得的最终洗脱液。比较例1、比较例3和本发明实施例1中的残余蛋白量分别为232 μ g/mL、301 μ g/mL和041 μ g/mL,而比较例2的残余蛋白量显著更高(33,730 μ g/mL) (图6中的(a))。

[0110] 纯度比率代表分离的颗粒相对于蛋白浓度的数目。基于UC方法的比较例1显示了1.0的纯度比率,比较例2显示了0.1的纯度比率,并且比较例3显示了1.8的纯度比率,而本发明实施例1显示了显著更高的3.5的纯度比率(图6中的(c))。

[0111] 实验实施例3. 基于蛋白标记物和微小RNA比较胞外泡囊分离性能

[0112] 使用蛋白质印迹法测量从三种不同方法(本发明实施例1,比较例1和比较例3)分离的胞外泡囊的蛋白标记物。已知外泌体含有蛋白标记物诸如ALIX (ALG-2-相互作用蛋白X)、TSG101(肿瘤易感基因101蛋白)、HSP70(热休克蛋白)和四跨膜蛋白CD63、CD81和CD9。使用四种参考蛋白标记物(ALIX, TSG101: 内部蛋白标记物; CD9和CD81: 表面蛋白标记物), 本发明人分析了分离的胞外泡囊的特性(图7中的(a))。

[0113] 蛋白质印迹方法简述如下: 使用SDS-PAGE Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel (456-1035; Bio-rad, USA), 利用凝胶电泳分离蛋白样品。使用兔多克隆抗体(1:2,000稀释)抗-CD9(ab92726)、抗-CD81(ab109201)、抗-ALIX(ab186429)、抗-TSG101(ab125011)和山羊抗-兔IgG H&L (HRP) (ab205718) (Abcam, Cambridge, UK) 在其上进行免疫印迹。使用增强化学发光(ECL)溶液和ChemiDoc™ XRS+系统(Bio-Rad, USA)分析蛋白条带。

[0114] 基于关于标记物的蛋白质印迹的结果,从蛋白条带的强度可以测量蛋白标记物的总水平(图7中的(b)和(c))。外泌体蛋白标记物的水平如下: 本发明实施例1>比较例3>比较

例1。

[0115] 简单描述RNA提取和定量方法,使用seraMir外泌体RNA纯化试剂盒(RA806A-1, SBI, USA)分离RNA。所有的分离过程按照制造商的方案进行。为了定量EV miRNA标记物,使用TaqMan MicroRNA RT试剂盒(4366596, Life Technologies, USA)和TaqMan Micro RNA测定(4427975, Life Technologies, USA)进行RNA洗脱液的逆转录。在该过程中,使用TaqMan Universal Master Mix II, no UNG(4440040, Life Technologies, USA)和miRNA测定hsa-let-7a-5p, ID 000377和hsa-miR-142-3p, ID 000464。使用Agilent真核细胞总RNA Pico芯片和在Agilent 2100生物分析仪(Agilent Technologies, USA)上对于RNA洗脱液进行另外的实验。

[0116] 基于提取总RNA的结果和比较其量, RNA量如下: 本发明实施例1>比较例3>比较例1>比较例2(图7中的(d))。

[0117] 结果指示, 与其他胞外泡囊分离法相比, PLL聚集法产生含有更高丰度的RNA的微泡。此外, 基于RT-qPCR实验(使用hsa-let-7a-5p和hsa-miR-142-3p作为已知的胞外泡囊的miRNA标记物)的结果, 与UC法相比, PLL聚集法显示了类似的Ct值(图7中的(e))。

[0118] 实验实施例4. 形成衍生于阳离子聚合物的胞外泡囊聚集体

[0119] 胞外泡囊和聚阳离子聚合物的 ζ 电势分析法简述如下: 使用 ζ 电势分析仪(Zetasizer Pro; Malvern Panalytical; UK), 测量根据比较例1分离的胞外泡囊、PLL溶液(10mg/mL)和PLL和胞外泡囊聚集体的 ζ 电势。由于难以将聚集体重悬浮于去离子水中, 所以将来自1mL血浆的聚集体沉淀(PLL 0.5mg/mL)首先重悬浮于10 μ L GuTc溶液(10M)中, 然后将990 μ L去离子水加入该溶液。使用涡旋混合器将该混合物小心分散5分钟。

[0120] 结果显示在图8的(a)中。

[0121] 胞外泡囊显示-19.7mV的负电荷, 而PLL溶液(10mg/mL)显示42.4mV的强正电荷 ζ 电势。当胞外泡囊结合至PLL聚合物时, 胞外泡囊-PLL聚集体的 ζ 电势被中和至-5.6mV。结果表明胞外泡囊的负电荷和PLL聚合物的正电荷之间的强静电相互作用。白蛋白显示弱负电荷, 而 η -球蛋白显示药理学正电荷。在一个实施例中, 纤维蛋白原显示-18.7mV的负电荷(类似于胞外泡囊), 因此与阳离子PLL强烈相互作用(图8中的(a)和(b)和图9)。

[0122] 在理解血浆蛋白和PLL的 ζ 电势后, 本发明人研究了当向其加入PLL溶液时缺乏胞外泡囊的血浆的聚集体形成的可能性(图8中的(d))。尽管缺乏胞外泡囊, 但是发现与对照血浆相比相对较弱的聚集体形成。因此, 本发明人使用血清(无纤维蛋白原)和PLL进一步研究了缺乏胞外泡囊的血清的聚集体形成(图8中的(e)和(f))。出人意料地, 没有观察到明显的聚集体形成。结果显示, 血浆蛋白和PLL彼此通过电相互作用聚集, 并且纤维蛋白原是 PLL聚集的主要蛋白。

[0123] 接下来, 研究了温育温度对于胞外泡囊-PLL聚集体形成的影响。将血浆-PLL聚合物混合物在4 $^{\circ}$ C和25 $^{\circ}$ C分别温育10分钟, 然后离心。胞外泡囊聚集在4 $^{\circ}$ C比在25 $^{\circ}$ C发生效率远远更高(图10)。

[0124] 随着PLL浓度增加, 沉淀的尺寸和形状也增加, 并且沉淀变得更清晰(图8中的(b)和图9)。

[0125] 实验实施例5. 重悬浮来自聚集体的胞外泡囊

[0126] 通过简单地将PLL溶液加入血浆, 成功地获得了胞外泡囊聚集体。为了分离胞外泡

囊用于随后的应用,要求将胞外泡囊聚集体重悬浮于适当的缓冲液中。然而,强烈聚集的聚合物和胞外泡囊不能够悬浮于去离子水或PBS溶液中(图11中的(a))。因此,将离液剂(GuTc)用于溶解PLL和胞外泡囊沉淀。测量了基于各种浓度的GuTc溶液(0至4M)的胞外泡囊-PLL聚集体的溶解能力。

[0127] 使用NTA,分析基于GuTc浓度的分离的胞外泡囊的尺寸和颗粒浓度(图11中的(b)和(c))。随着GuTc溶液的浓度增加,胞外泡囊的尺寸逐渐减小。在低GuTc浓度(1M和2M)下,观察到较大颗粒(约300nm)。在1MGuTc时,胞外泡囊浓度极低(0.03×10^{10})。另一方面,在高GuTc浓度(4M)时,粒径峰值显著降低至102nm。因此,认为胞外泡囊完全从聚集体中释放。在血浆中固定PLL浓度(0.2mg/mL)下,在各种浓度溶液之中4MGuTc溶液显示了最佳的聚集体溶解效果。优化的GuTc缓冲液在1分钟内成功地溶解了胞外泡囊聚集体沉淀。

[0128] 从基于洗涤溶液中的离液剂(GuTc)浓度测量蛋白杂质和微泡的量的结果,确定了在使用2M GuTc的洗涤过程中获得了最高纯度(颗粒/蛋白浓度)(图12)。

[0129] 当洗脱液中含有蛋白酶K时,观察到了胞外泡囊聚集体沉淀的溶解(图13)。

[0130] 尽管已经显示和描述了本发明的数个实施例,但是本发明所属领域的普通技术人员应当理解,可以在不背离本发明的原理或实质的情况下对该实施例进行改动。本发明的范围将通过后附权利要求和它们的等同物来限定。

[0131] 参考编号

[0132] 10:聚集体11:微泡

[0133] 12:多价阳离子物质110:提取管

[0134] 120,和120a:捕获滤器

[0135] 工业适用性

[0136] 根据本发明的方法可以在没有离心过程的情况下使用多价阳离子物质从生物样品中提取微泡,因此可以用于利用微泡的各个工业领域。

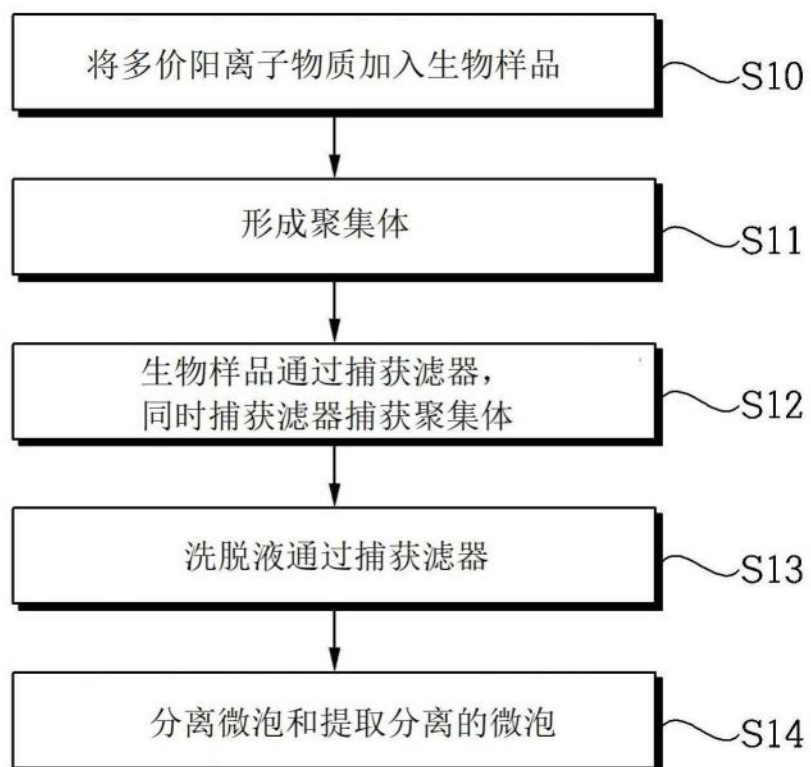


图1

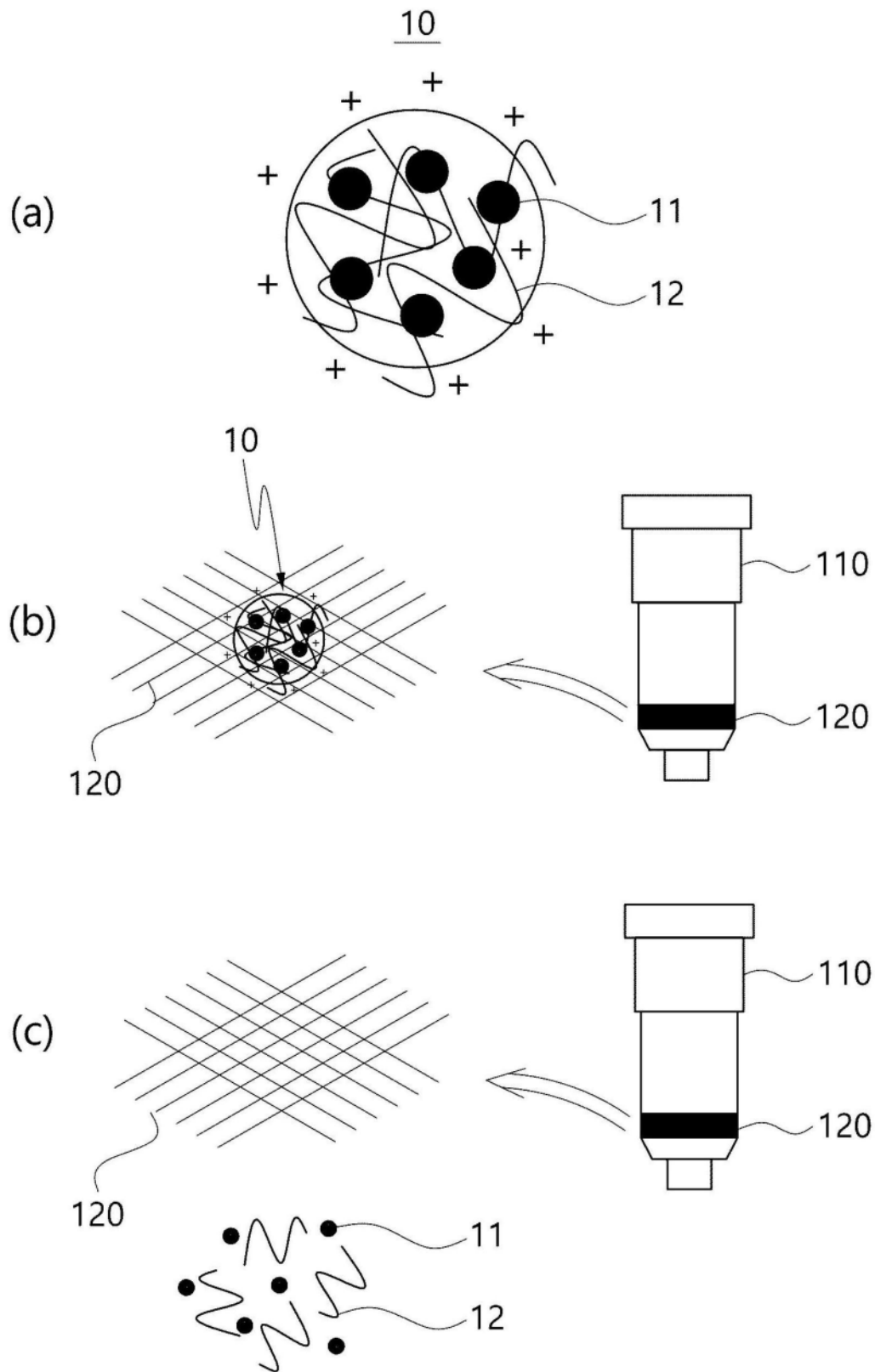


图2

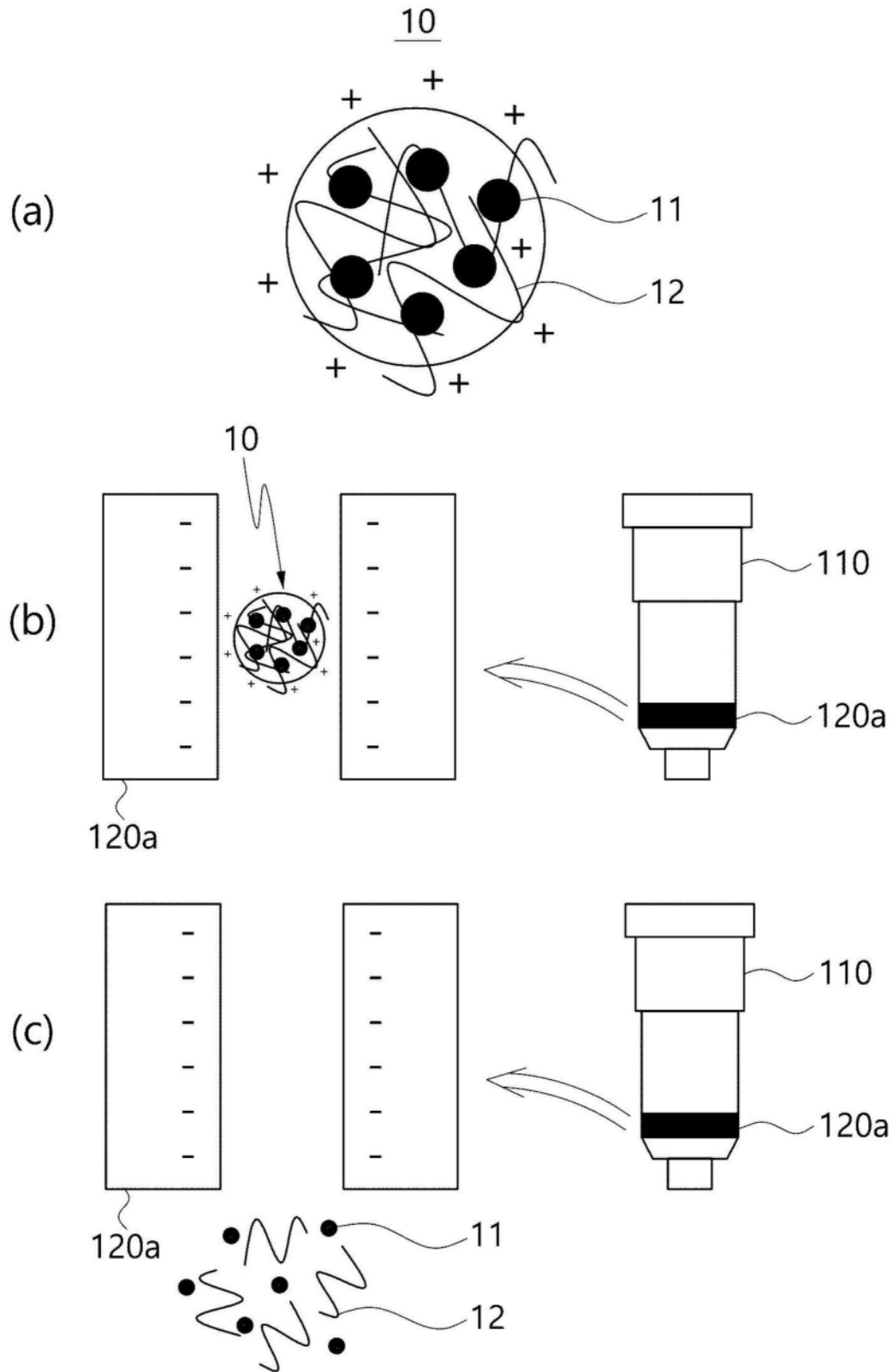


图3

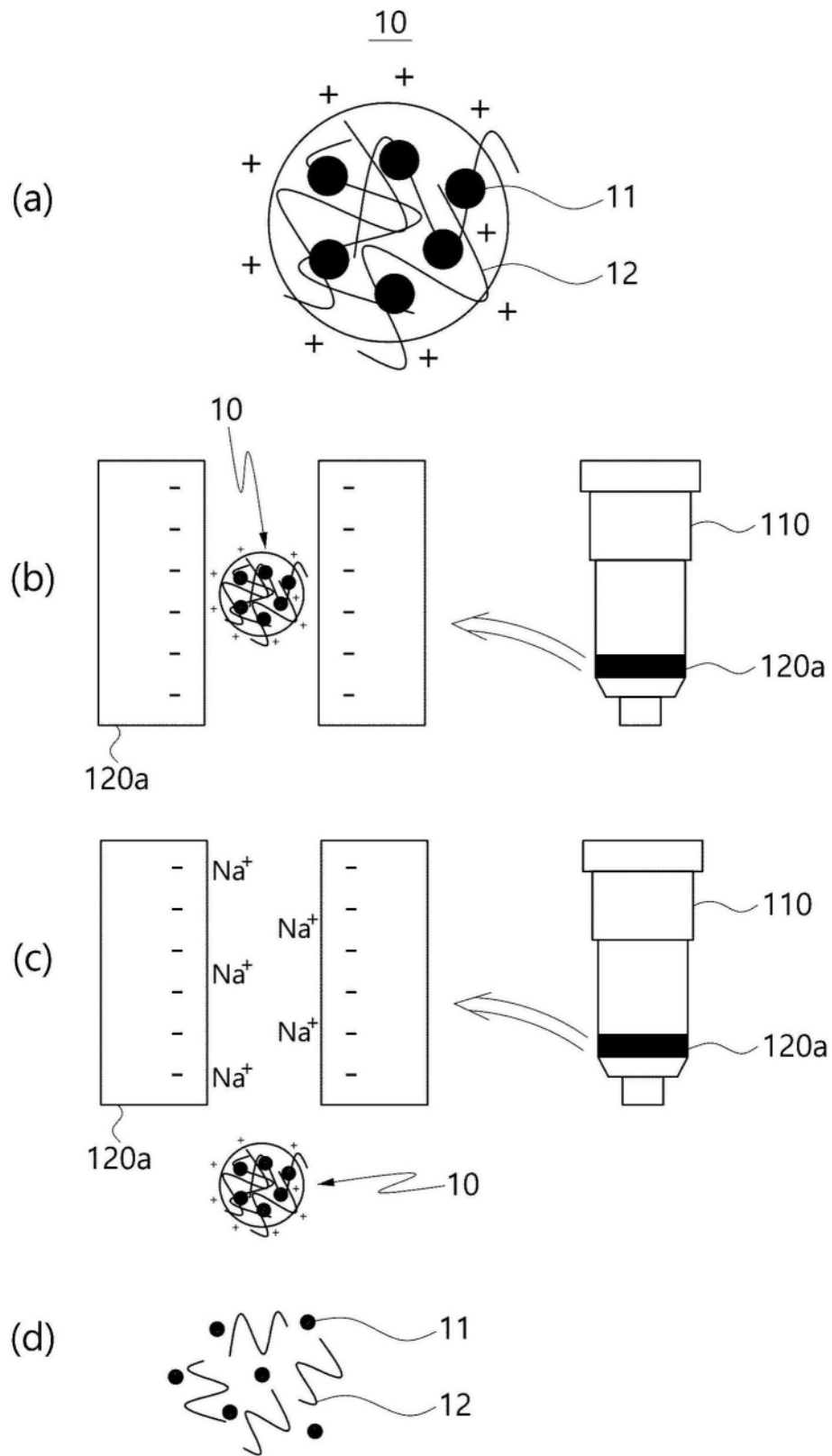


图4

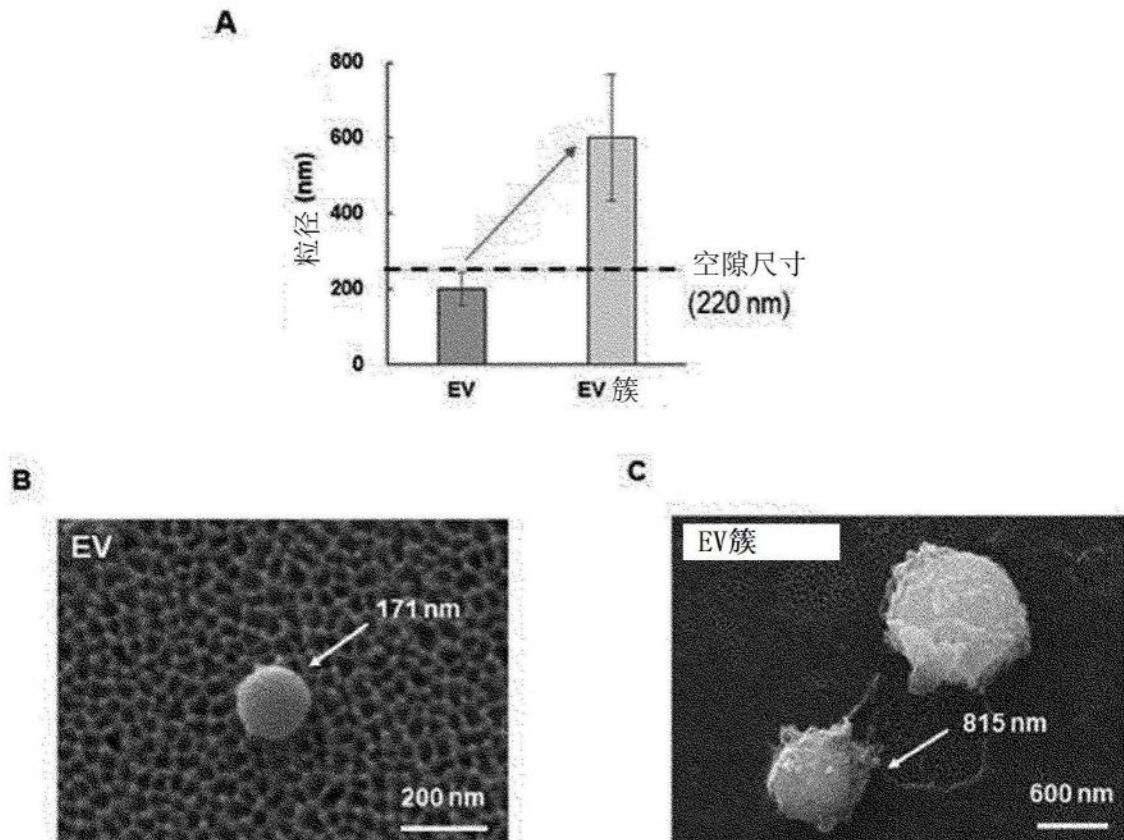


图5

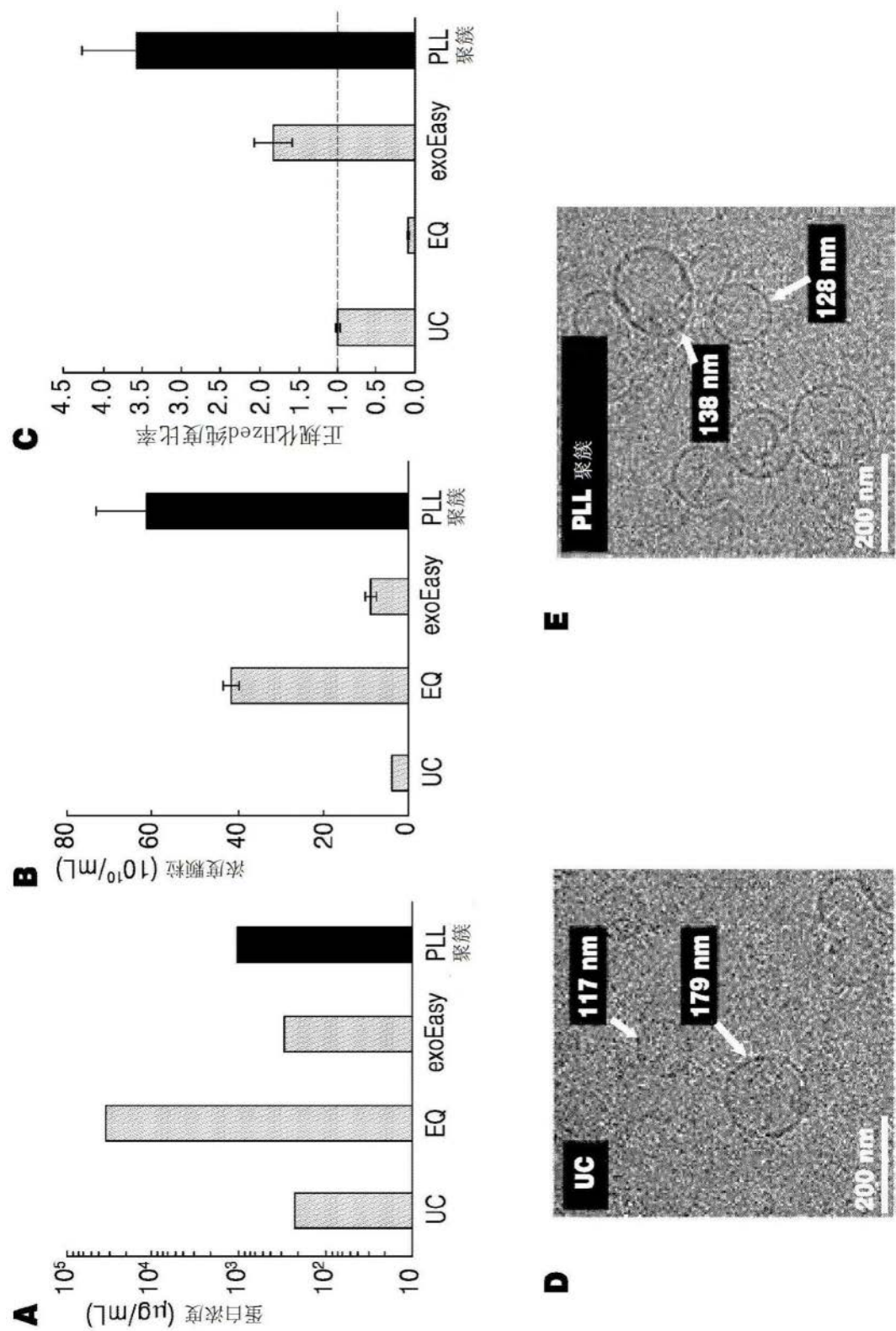


图6

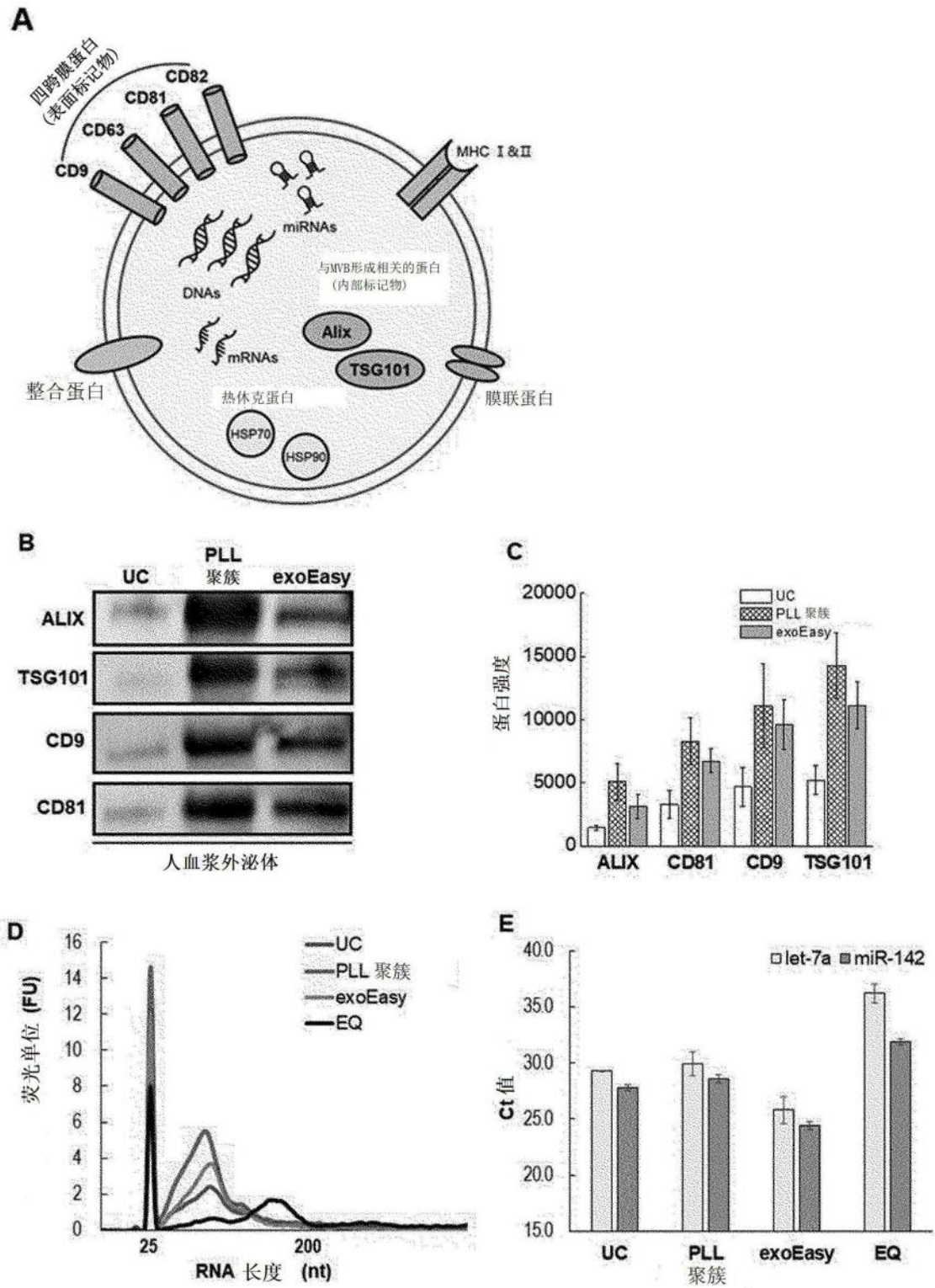


图7

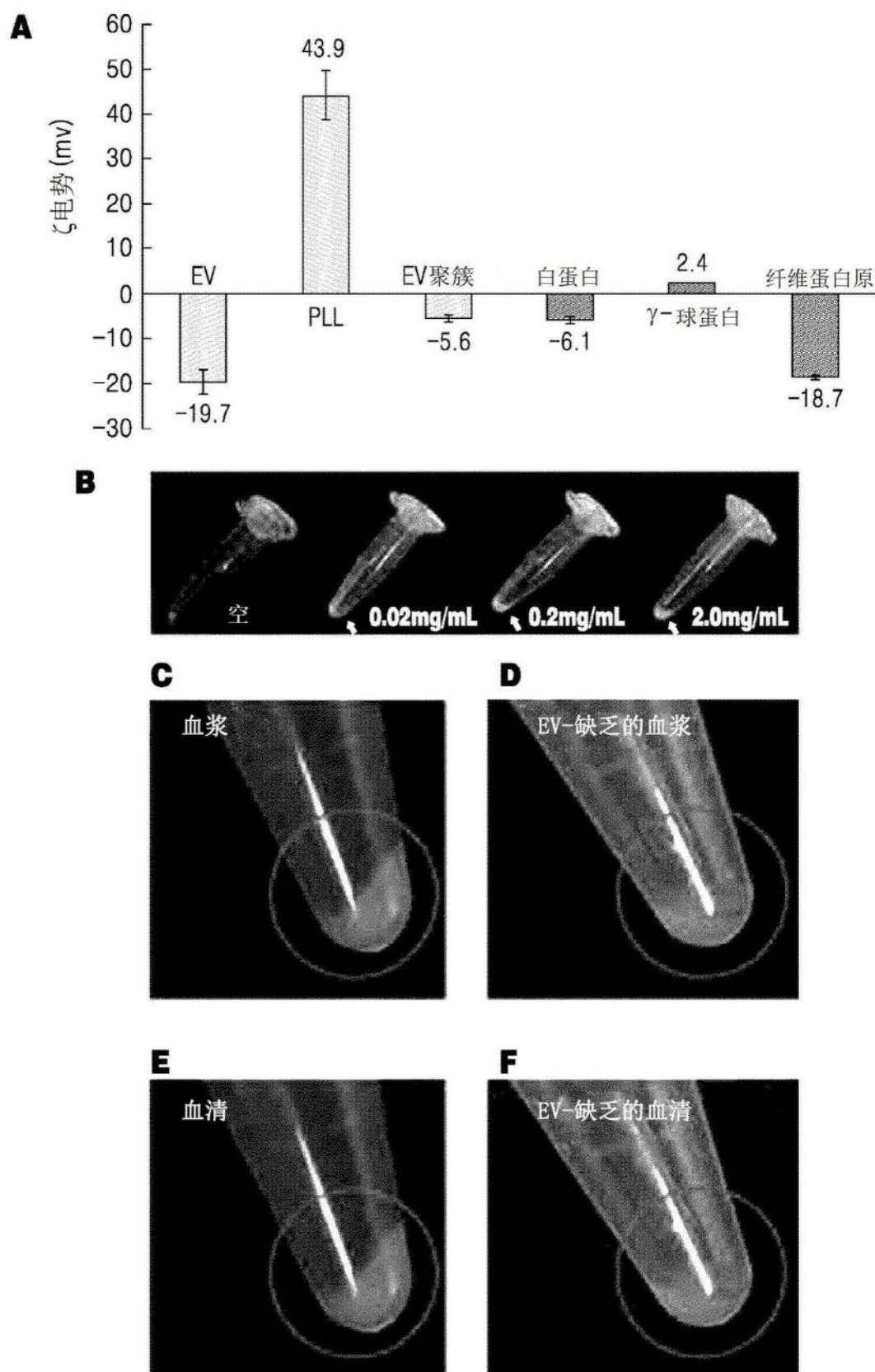


图8

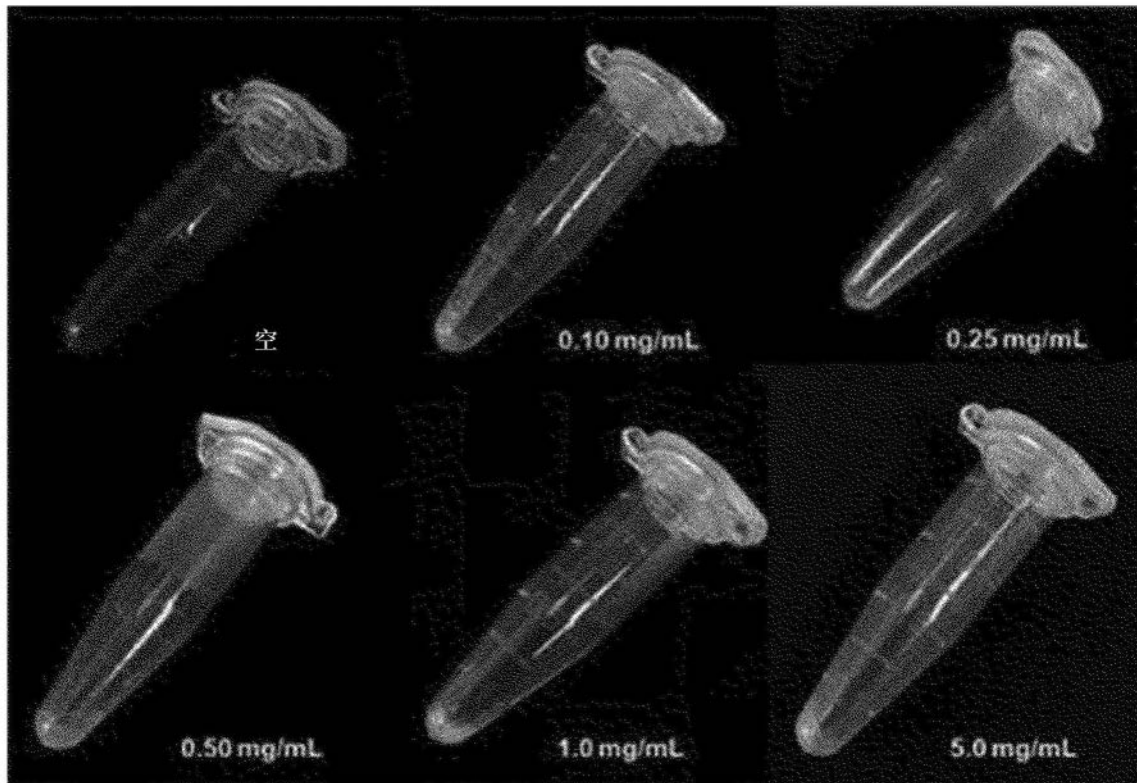


图9

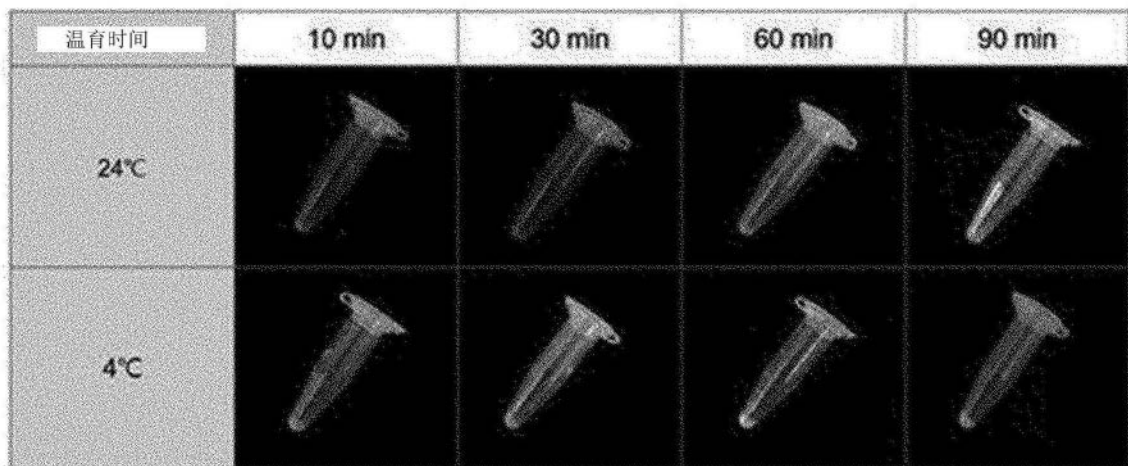


图10

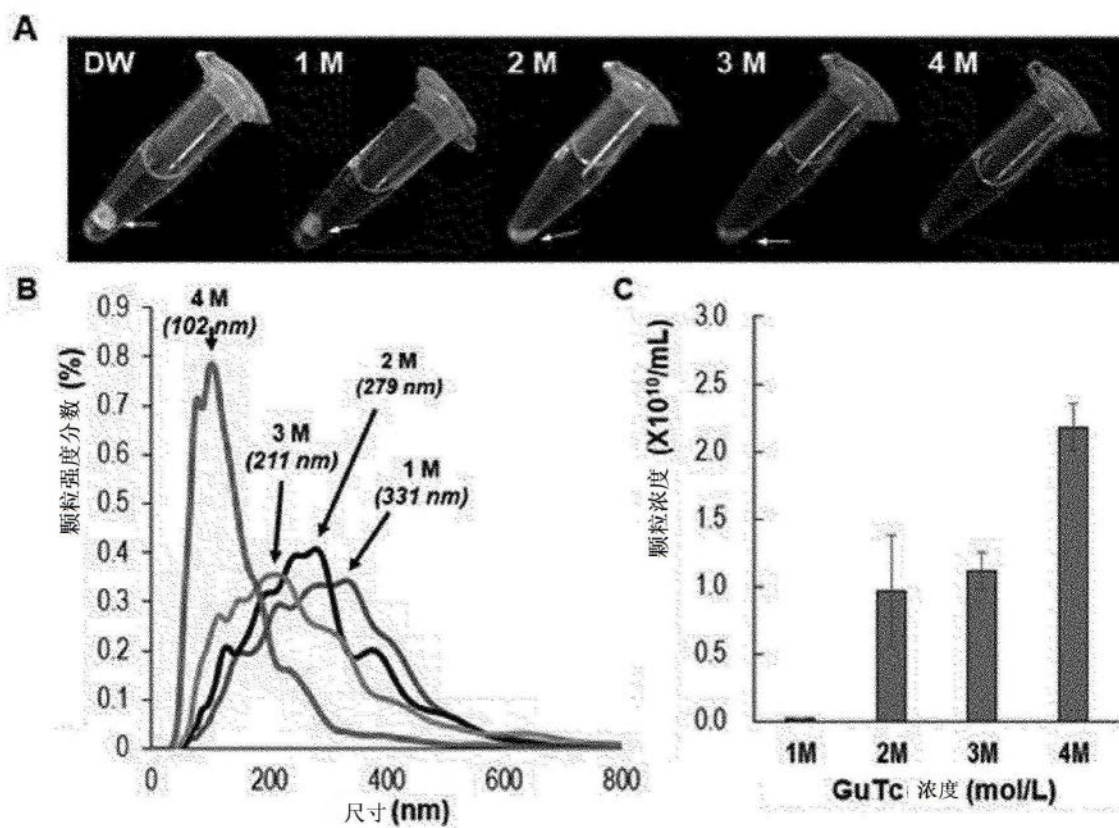


图11

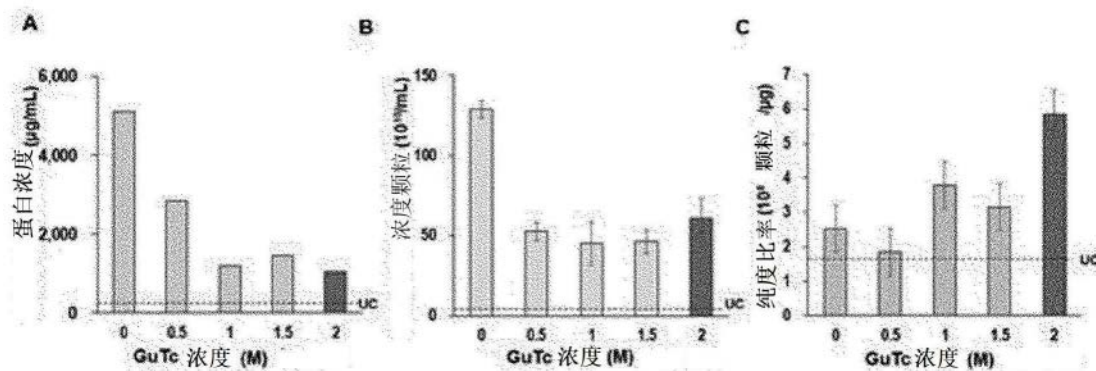


图12

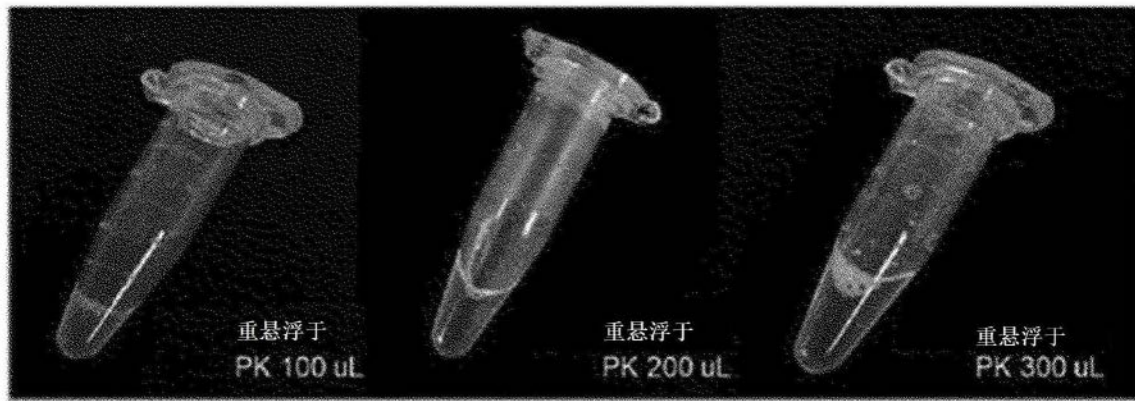


图13