



(21) 申请号 202211275324.7

(22) 申请日 2022.10.18

(71) 申请人 山东杰凯生物科技有限公司

地址 250000 山东省济南市中国(山东)自
由贸易试验区济南片区综合保税区港
兴三路北段1号济南药谷研发平台区1
号楼A座2502室

申请人 安龄(上海)生物科技有限公司

(72) 发明人 田晓婷 孙美玉 王健 赵凯

李森朋 刘爽 李倩 郝润宇
孙辉

(74) 专利代理机构 北京众达德权知识产权代理
有限公司 11570

专利代理师 陈忠忠

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/078 (2010.01)

B01D 61/14 (2006.01)

B01J 41/00 (2006.01)

B01D 15/08 (2006.01)

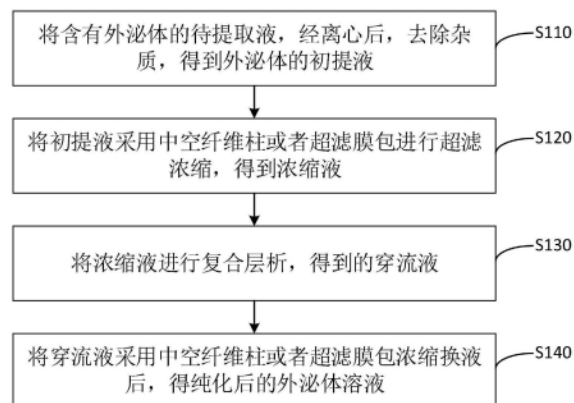
权利要求书1页 说明书8页 附图12页

(54) 发明名称

一种分离外泌体的纯化方法及外泌体试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种分离外泌体的纯化方法和外泌体试剂盒,包括:将含有外泌体的待提取液,经离心后,去除杂质,得到外泌体的初提液;将所述初提液采用中空纤维柱或者超滤膜包进行超滤浓缩,得到浓缩液;将所述浓缩液进行复合层析,得到的穿流液;将所述穿流液采用中空纤维柱或者超滤膜包浓缩换液后,得纯化后的外泌体溶液。根据本发明实施例的分离外泌体的纯化方法,能够满足大规模的外泌体制备的需求,也可以低成本高效率的获得高纯度的外泌体。



1. 一种分离外泌体的纯化方法,其特征在于,包括:
将含有外泌体的待提取液,经离心后,去除杂质,得到外泌体的初提液;
将所述初提液或处理后的初提液进行复合层析,得到的穿流液;
其中,对所述初提液和所述穿流液中的至少一个液体采用中空纤维柱或者超滤膜包进行超滤浓缩,以得纯化后的外泌体溶液。
2. 根据权利要求1所述的分离外泌体的纯化方法,其特征在于,对所述待提取液离心时,采用的离心加速度的范围在2000g-10000g之间。
3. 根据权利要求1或2所述的分离外泌体的纯化方法,其特征在于,所述待提取液包括体液和/或培养液,所述培养液包括细胞的培养上清液、细菌的培养上清液的一种或两种。
4. 根据权利要求3所述的分离外泌体的纯化方法,其特征在于,所述体液包括血清、血浆、精液、腹水、羊水、脑脊液、尿液、牛奶和乳汁中的一种或多种混合。
5. 根据权利要求1所述的分离外泌体的纯化方法,其特征在于,对处理后的初提液进行复合层析,得到的穿流液,包括:
将所述初提液采用中空纤维柱或者超滤膜包进行超滤浓缩,得到浓缩液;
对所述浓缩液进行复合层析,得到的所述穿流液。
6. 根据权利要求5所述的分离外泌体的纯化方法,其特征在于,将所述初提液采用中空纤维柱或者超滤膜包进行超滤浓缩,得到浓缩液,包括:
对所述初提液进行抽真空过滤;
对抽真空过滤后的初提液采用中空纤维柱或者超滤膜包进行超滤浓缩,得到浓缩液。
7. 根据权利要求1所述的分离外泌体的纯化方法,其特征在于,所述中空纤维柱或者超滤膜包的分子截流量为100kd-700kd。
8. 根据权利要求1所述的分离外泌体的纯化方法,其特征在于,将所述初提液或处理后的初提液进行复合层析,得到的穿流液,包括:
将所述初提液或处理后的初提液进行阴离子交换、疏水,及分子筛结合方式进行复合层析,得到的穿流液。
9. 根据权利要求1所述的分离外泌体的纯化方法,其特征在于,复合层析的填料的粒径为20-200 μm ,配基为辛胺。
10. 一种外泌体试剂盒,包括外泌体,所述外泌体由上述实施例所述的分离外泌体的纯化方法制备得到。

一种分离外泌体的纯化方法及外泌体试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学技术领域,具体地,涉及一种分离外泌体的纯化方法及外泌体试剂盒。

背景技术

[0002] 外泌体是一类细胞分泌的具有磷脂双分子层结构的细胞外囊泡,大小为30-150nm,几乎所有类型的细胞都能分泌,广泛存在于血清、血浆、尿液,脑脊液和精液等各种体液中。外泌体携带核酸和蛋白质等,在体内信号转导中的作用起重要作用。目前外泌体作为治疗药物主要集中在以下两方面,一个是作为药物传递载体,传递的药物主要为药物分子(阿霉素、紫杉醇等)、核酸(miRNA, siRNA等),蛋白等;另一个即外泌体直接作为治疗药物,主要为MSC外泌体,目前已有MSC-exo治疗多种疾病的报告。但是如何分离得到大量的具有生物学功能的外泌体是制约后期临床应用的问题之一。

发明内容

[0003] 本发明是针对上述问题提出的,本发明提供了一种分离外泌体的纯化方法,用以解决外泌体分离的制约,以满足大规模的外泌体需求,也可以低成本高效率的获得高纯度的外泌体。

[0004] 本发明还提供一种分离外泌体的纯化方法,其特征在于,包括:

[0005] 将含有外泌体的待提取液,经离心后,去除杂质,例如细胞碎片等,得到外泌体的初提液;

[0006] 将所述初提液或处理后的初提液进行复合层析,得到的穿流液;

[0007] 并对所述初提液和所述穿流液中的至少一个液体采用中空纤维柱或者超滤膜包进行超滤浓缩,以得纯化后的外泌体溶液。

[0008] 根据本发明实施例的方法,不仅可以满足大量外泌体的提取,满足临床的需求,也可以进行少量外泌体的提取,满足科研的需求,不需要进行多次层析,操作步骤简单,不需要高盐溶液,因此对外泌体结构和活性没有影响,单次层析就可以获得高纯度高活性的外泌体。

[0009] 根据本发明的一个实施例,对所述待提取液离心时,采用的离心加速度的范围在2000g-10000g之间。通过该离心加速度有利于分离出细胞碎片等杂质。

[0010] 根据本发明的一个实施例,所述待提取液包括体液和/或培养液。

[0011] 根据本发明的一个实施例,所述体液包括血清、血浆、精液、腹水、羊水、脑脊液、尿液、牛奶和乳汁中的一种或多种混合。

[0012] 根据本发明的一个实施例,所述培养液包括细胞的培养上清液、细菌的培养上清液的一种或两种。

[0013] 根据本发明的一个实施例,对处理后的初提液进行复合层析,得到的穿流液,包括:将所述初提液采用中空纤维柱或者超滤膜包进行超滤浓缩,得到浓缩液;对所述浓缩液

进行复合层析,得到的穿流液。

[0014] 根据本发明的一个实施例,将所述初提液采用中空纤维柱或者超滤膜包进行超滤浓缩,得到浓缩液,包括:对所述初提液进行抽真空过滤;对抽真空过滤后的初提液采用中空纤维柱或者超滤膜包进行超滤浓缩,得到浓缩液。

[0015] 根据本发明的一个实施例,所述中空纤维柱或者超滤膜包的分子截流量为100kd-700kd。

[0016] 根据本发明的一个实施例,将所述浓缩液进行复合层析,得到的穿流液,包括:将所述浓缩液进行阴离子交换、疏水,及分子筛结合方式进行复合层析,得到的穿流液。

[0017] 根据本发明的一个实施例,复合层析的填料的粒径为20-200 μ m,配基为辛胺。

[0018] 本发明还提供一种外泌体试剂盒,包括外泌体,所述外泌体由上述实施例所述的分离外泌体的纯化方法制备得到。

[0019] 本发明的上述技术方案至少具有如下效果之一:

[0020] 根据本发明实施例的分离外泌体的纯化方法,该方法不仅可以满足大量外泌体的提取,满足临床的需求,也可以进行少量外泌体的提取,满足科研的需求,不需要进行多次层析,操作步骤简单,不需要高盐溶液,因此对外泌体结构和活性没有影响,单次层析就可以获得高纯度高活性的外泌体。

附图说明

[0021] 图1为本发明实施例的分离外泌体的纯化方法的流程图;

[0022] 图2为本发明实施例1对应的293外泌体大小和分布图;

[0023] 图3为本发明实施例1对应的293外泌体复合层析的电镜图;

[0024] 图4为对比例1对应的293外泌体大小和分布图;

[0025] 图5为对比例1对应的293外泌体超离后的电镜图;

[0026] 图6为实施例1和对比例1对应的293外泌体标志性蛋白检测对比图;

[0027] 图7为本发明实施例2对应的血清外泌体大小和分布图;

[0028] 图8为本发明实施例2对应的血清外泌体复合层析的电镜图;

[0029] 图9为对比例2对应的血清外泌体大小和分布图;

[0030] 图10为对比例2对应的血清外泌体超离后的电镜图;

[0031] 图11为实施例2和对比例2对应的血清外泌体标志性蛋白检测对比图;

[0032] 图12为本发明实施例3对应的MSC外泌体大小和分布图;

[0033] 图13为本发明实施例3对应的MSC外泌体复合层析的电镜图;

[0034] 图14为对比例3对应的MSC外泌体大小和分布图;

[0035] 图15为对比例3对应的MSC外泌体超离后的电镜图;

[0036] 图16为实施例3和对比例3对应的MSC外泌体标志性蛋白检测对比图。

具体实施方式

[0037] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例,对本发明实施例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的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于所描述的本发明的实施例,本领域普通技术人员所获

得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0038] 下面首先对本发明的技术问题进行说明。

[0039] 外泌体分离纯化的方法有超速离心、免疫亲和层析、超滤离心、凝胶过滤层析、聚合物沉淀等方法。其中,超速离心是最常用的外泌体分离方式,此方法可以获得较纯的外泌体,但此方法耗时耗力,处理样本数量小,分离效率比较低。免疫亲和层析较超速离心产率和纯度高,但是不适合大样本,并且将外泌体从磁珠上洗脱可能会损伤外泌体的结构。超滤离心法简单高效,不影响外泌体的生物活性,但是分离效率低,不适合大样本分离。凝胶过滤层析也叫排阻层析或分子筛,分离得到的外泌体形态完整,但因其流速低和上样量低严重制约了其产能。聚合物沉淀法操作简单,快速,外泌体回收率相对较高,但是仍混有大量的杂质蛋白,因此分离得到的外泌体纯度低。

[0040] 基于上文中存在的技术问题,本发明提供一种分离外泌体的纯化方法,该方法不仅可以满足大量外泌体的提取,满足临床的需求,也可以进行少量外泌体的提取,满足科研的需求,不需要进行多次层析,操作步骤简单,不需要高盐溶液,因此对外泌体结构和活性没有影响,单次层析就可以获得高纯度高活性的外泌体。

[0041] 下面具体描述根据本发明实施例的分离外泌体的纯化方法。如图1所示,该方法包括S110-S140。

[0042] S110,将含有外泌体的待提取液,经离心后,去除杂质,得到外泌体的初提液。其中,杂质可以为细胞碎片等。

[0043] 在本发明的实施例中,待提取液可以是血清、血浆、精液、腹水、羊水、脑脊液、尿液、牛奶和乳汁中的一种或多种混合的体液中。也可以是细胞的培养上清液、细菌的培养上清液的一种或两种。

[0044] 在本发明的一个实施例中,在对待提取液离心过程中采用的离心加速度可以在2000g-10000g之间,例如,可以是2000g、3000g、4000g、5000g、6000g、7000g、8000g、9000g或10000g。

[0045] S120,将初提液采用中空纤维柱或者超滤膜包进行超滤浓缩,得到浓缩液。

[0046] 在本申请的一个实施例中,对初提液进行超滤浓缩之前,还可以对初提液进行抽真空过滤。例如,将离心后得到的初提液的上清液一次性真空抽滤瓶过滤,以去除大于设定大小的囊泡。

[0047] 在本发明的一个实施例中,中空纤维柱或者超滤膜包的分子截流量为100kd-700kd,例如,可以是100kd、200kd、300kd、400kd、500kd、600kd或700kd。

[0048] S130,将浓缩液进行复合层析,得到的穿流液。

[0049] 在本申请的一个实施例中,复合层析进一步包括:

[0050] S131,缓冲液的配制。进一步可以包括洗脱液配置、平衡液配置和柱子保存液。

[0051] 其中,洗脱液可以是NaOH溶液经过真空过滤后得到。平衡液可以是磷酸盐缓冲溶液经过真空抽滤瓶过滤后得到。柱子保存液可以为20%乙醇经过真空抽滤瓶过滤后得到。

[0052] S132,上机。

[0053] 采用蛋白纯化仪进行纯化。开机清洗后,将蛋白纯化仪与层析柱连接,用双蒸水清洗至电导、UV和pH值稳定后,采用磷酸缓冲盐溶液平衡至电导、UV和pH值稳定后,将UV280归零,将超滤浓缩后的样品一定的量,例如50ml,使用AKTA上样泵上样,上样速度为2.5ml/

min,根据UV280的数值进行收样,收集得到的穿流液。

[0054] S133,柱清洗。采用磷酸缓冲盐溶液洗脱至平衡,NaOH溶液清洗层析柱,至少10个柱体积层析柱清洗完毕后,ddH₂O清洗系统泵和上样泵,至pH值降到7.0,更换20%乙醇溶液清洗系统泵和样品泵。

[0055] 在本发明的实施例中,复合层析中涉及到的填料粒径为20-200 μ m,配基为辛胺,该填料既有分子筛的功能,又有阴离子交换以及疏水相结合的多模式填料。

[0056] 在S140,将穿流液采用中空纤维柱或者超滤膜包浓缩换液后,得纯化后的外泌体溶液。

[0057] 在本发明的一个实施例中,中空纤维柱或者超滤膜包的分子截流量为100kd-700kd。

[0058] 在本发明的一些实施例中,上述步骤110-步骤140只是示例性说明,在一些实施例中也可以不通过步骤120浓缩过程,直接先进行步骤130复合层析,再进行步骤140浓缩。在实际制备过程中,可以根据样品初始体积合理选择。例如,如果初始体积(比如血清)比较少,可以不用浓缩直接进行复合层析,层析完成后再通过浓缩进一步提高外泌体的浓度。反之,也可以只操作步骤110-步骤130,而不进行最后步骤140。即在初始体积特别大时,可以先浓缩再复合层析。当要求较多数量的外泌体,可以采用二次浓缩,因为在层析纯化的过程中会导致体积增加,从而提高外泌体数量。

[0059] 根据本发明实施例的分离外泌体的纯化方法,不仅可以满足大量外泌体的提取,满足临床的需求,也可以进行少量外泌体的提取,满足科研的需求,不需要进行多次层析,操作步骤简单,不需要高盐溶液,因此对外泌体结构和活性没有影响,单层层析就可以获得高纯度高活性的外泌体。与现有的外泌体纯化方式相比,通过不同规格(载量)的层析柱切换,可以实现获取不同体积的外泌体溶液的提取,例如体积范围可以达到2ml-600L之间。

[0060] 另外,本发明还提供一种外泌体试剂盒,包括外泌体,其中外泌体由上述实施例分离外泌体的纯化方法制备得到。具体可参考上述实施例的制备过程,其包装过程可参考现有的技术中的包装方法。

[0061] 为使本领域的技术人员能够更好的理解本发明的技术方案,下面结合具体实施例对本发明作进一步的详细说明。

[0062] 本发明的实施例中,取含有外泌体的待提取液进行浓缩和复合层析和/或浓缩后即可获得纯化后的外泌体溶液。有外泌体的溶液包括血清、血浆、精液、腹水、羊水、脑脊液、尿液、牛奶和乳汁,还包括细胞或者细菌的培养上清液。

[0063] 复合层析的填料选用的填料为cityva公司的Capto core 400/700公司的产品。粒径为20-200 μ m,配基为辛胺。填料使用5-20个柱体积的缓冲液平衡,然后按照样品与填料体积比1:1-10:1的比例进行上样,样品在层析柱上停留时间不能低于1.5min,穿流液也可以理解为收集的外泌体纯化液。比外泌体小的蛋白和其他杂质将被吸附到层析柱上,而外泌体直接流出,从而达到外泌体与杂质分离的目的。

[0064] 本发明中涉及的材料及组分未具体说明的,均可以为市售或根据本领域的技术人员公知的方法制备得到,对此为本领域的公知,在此不再赘述。

[0065] 在下面的实施例中,样品来源分别为293细胞上清液、血清液、MSC细胞上清液。采用的方法为本发明实施例的分离外泌体的纯化方法,和现有的常用的超离纯化方法进行比

较说明。

[0066] 实施例1

[0067] 对HEK-293悬浮细胞上清液中外泌体的分离纯化。

[0068] 1.取1L HEK-293悬浮细胞的上清液,去掉细胞沉淀后,在10000g离心30min,进一步去除细胞碎片;

[0069] 2.将离心后的上清液用0.22 μ m的一次性真空抽滤瓶过滤去除大于0.22 μ m的囊泡;

[0070] 3.选用截留大小为700KD的中空纤维柱,将过滤后的细胞上清用中空纤维柱浓缩20倍,跨膜压控制在4psi,浓缩至50ml。

[0071] 4.复合层析

[0072] 4.1缓冲液的配制

[0073] 洗脱液:1.0M NaOH溶液,配制完成后用0.2 μ m的真空过滤瓶过滤得到。

[0074] 平衡液:0.01M磷酸盐缓冲溶液,pH为7.4,配制完成后用0.2 μ m真空抽滤瓶过滤得到。

[0075] 柱子保存液:20%乙醇,配制完成后用0.2 μ m的真空抽滤瓶过滤得到。

[0076] 4.2上机

[0077] ATKA explorer 100/AVANT 150系统开机清洗后连接capto core 700层析柱(选用10ml复合层析柱),用双蒸水清洗至电导、UV和pH值稳定后pH 7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液平衡至电导、UV和pH值稳定后,将UV280归零,将超滤浓缩后的样品50ml使用AKTA上样泵上样,上样速度为2.5ml/min,根据UV280的数值进行收样,在UV280达到400mAU后开始收样,降到400mAU时停止收样,收集得到的外泌体纯化液为55ml。

[0078] 4.3柱清洗

[0079] pH 7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液洗脱至平衡,1.0M NaOH溶液清洗层析柱,至少10个柱体积,层析柱清洗完毕后,ddH₂O清洗系统泵和上样泵,至pH值降到7.0,更换20%乙醇溶液清洗系统泵和样品泵。

[0080] 对获得的293外泌体的大小和分布进行检测,结果如图2。图2示出了粒径检测外泌体大小和分布。粒径检测结果显示提取的外泌体粒径。

[0081] 对获得的293外泌体外泌体的形态进行检测,结果如图3。参考图3所示的293外泌体复合层析电镜图,可以看出完整的外泌体。

[0082] 对比例1HEK-293细胞上清的外泌体分离纯化。

[0083] 采用超离的方法分离纯化HEK-293细胞上清中的外泌体,具体步骤如下:收集的细胞上清液200ml经2000g离心15min,去除死细胞;取上清液经10000g离心30分钟,去除细胞碎片等杂质;取上清液经120000g离心70分钟,可见管底片层沉淀,部分样品会有颜色,此沉淀主要成分即为外泌体;将沉淀用PBS溶液冲洗吹打重悬,再次120000g离心70分钟,小心弃干净上清,除掉一些吸附的杂质,沉淀即为外泌体,沉淀用100 μ L PBS重悬。获得的外泌体,在电子显微镜下观察,具体可以参考图3所示的293外泌体超离后电镜图。

[0084] 对获得的293外泌体的大小和分布进行检测,结果如图4。图4示出了粒径检测外泌体大小和分布。粒径检测结果显示提取的外泌体粒径。

[0085] 对获得的293外泌体外泌体的形态进行检测,结果如图5。参考图5所示的293外泌体超离后电镜图。

[0086] 对实施例1与对比例1的293外泌体标志性蛋白检测,参考图6所示的293外泌体标志性蛋白检测对比图。从图6中可以看出对比例1和实施例1均可以检测出外泌体的标志蛋白TSG101,平均分子量为46KDa;检测出外泌体的标志蛋白CD81,平均分子量为22KDa;检测出外泌体的标志蛋白CD9,平均分子量在23-27KDa之间。

[0087] 实施例2人血清中外泌体的分离纯化

[0088] 1.取2mL分离得到的人血清,加3mL PBS稀释至5mL,用0.22 μ m的一次性针式过滤器过滤掉大于0.22 μ m的囊泡。

[0089] 2.复合层析

[0090] 2.1缓冲液的配制洗脱液:1.0M NaOH溶液,配制完成后用0.2 μ m的真空过滤瓶过滤。

[0091] 平衡液:0.01M磷酸盐缓冲溶液,pH为7.4,配制完成后用0.2 μ m真空抽滤瓶过滤。

[0092] 柱子保存液:20%乙醇,配制完成后用0.2 μ m的真空抽滤瓶过滤。

[0093] 2.2上机

[0094] ATKA explorer 100/AVANT 150系统开机清洗后连接capto core 700层析柱(选用4.7mL复合层析柱),用双蒸水清洗至电导、UV和pH值稳定后,pH 7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液平衡至电导、UV和pH值稳定后,将UV280归零,将稀释后的血清5mL使用AKTA上样泵上样,上样速度为1mL/min,根据UV280的数值进行收样,在UV280达到400mAU后开始收样,降到400mAU时停止收样,收集得到的外泌体纯化液为7mL。

[0095] 2.3柱清洗

[0096] pH 7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液洗脱至平衡,1.0M NaOH溶液清洗层析柱,至少10个柱体积层析柱清洗完毕后,ddH₂O清洗系统泵和上样泵,至pH值降到7.0,更换20%乙醇溶液清洗系统泵和样品泵。

[0097] 对实施例1获得的血清外泌体的大小和分布进行检测,结果如图7。图7示出了粒径检测外泌体大小和分布。粒径检测结果显示提取的外泌体粒径。

[0098] 对实施例1获得的血清外泌体外泌体的形态进行检测,结果如图8。参考图8所示的血清外泌体复合层析电镜图,可以看出完整的外泌体。

[0099] 对比例2人血清的外泌体分离纯化

[0100] 采用超离的方法分离纯化人血清中的外泌体,具体步骤如下:

[0101] 将分离得到的人血清5mL经2000 $\times$ g离心15min,去除死细胞;取上清液经10000g离心30分钟,去除细胞碎片等杂质;取上清液经120000g离心70分钟,可见管底片层沉淀,部分样品会有颜色,此沉淀主要成分即为外泌体;将沉淀用PBS溶液冲洗吹打重悬,再次120000g离心70分钟,小心弃干净上清,除掉一些吸附的杂质,沉淀即为外泌体,沉淀用100 μ L PBS重悬。

[0102] 对比例2获得的血清外泌体的大小和分布进行检测,结果如图9。图9示出了粒径检测外泌体大小和分布。粒径检测结果显示提取的外泌体粒径分布。

[0103] 对比例2获得的血清外泌体外泌体的形态进行检测,结果如图10。参考图10所示的血清外泌体超离后电镜图。

[0104] 实施例2与对比例2的血清外泌体标志性蛋白检测,参考图11所示的血清外泌体标志性蛋白检测对比图。从图11中可以看出对比例2和实施例2都可以检测出外泌体的标志蛋

白TSG101,平均分子量为46KDa;检测出外泌体的标志蛋白CD81,平均分子量为22KDa;检测出外泌体的标志蛋白CD9,平均分子量在23-27KDa之间。

[0105] 实施例3对人间充质干细胞上清液外泌体的分离纯化

[0106] 1.取2L hUC-MSC细胞的上清液,去掉细胞沉淀后,在10000g离心30min,进一步去除细胞碎片。

[0107] 2.将离心后的上清液用0.22 μ m的一次性真空抽滤瓶过滤去除大于0.22 μ m的囊泡。

[0108] 3.浓缩:选用截留大小为700KD的中空纤维柱,将过滤后的细胞上清用中空纤维柱浓缩20倍,跨膜压控制在4psi,浓缩至100ml

[0109] 4.复合层析

[0110] 4.1缓冲液的配制洗脱液:1.0M NaOH溶液,配制完成后用0.2 μ m的真空过滤瓶过滤得到。平衡液:0.01M磷酸盐缓冲溶液,pH为7.4,配制完成后用0.2 μ m真空抽滤瓶过滤得到。

[0111] 柱子保存液:20%乙醇,配制完成后用0.2 μ m的真空抽滤瓶过滤得到。

[0112] 4.2上机

[0113] ATKA explorer 100/AVANT 150系统开机清洗后连接capto core 700层析柱(选用10ml复合层析柱),用双蒸水清洗至电导、UV和pH值稳定后,pH 7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液平衡至电导、UV和pH值稳定后,将UV280归零,将超滤浓缩后的样品100ml使用AKTA上样泵上样,上样速度为2.5ml/min,根据UV280的数值进行收样,在UV280达到400mAU后开始收样,降到400mAU时停止收样,收集得到的外泌体纯化液为105ml。

[0114] 4.3柱清洗

[0115] pH 7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液洗脱至平衡,1.0M NaOH溶液清洗层析柱,至少10个柱体积,层析柱清洗完毕后,ddH₂O清洗系统泵和上样泵,至pH值降到7.0,更换20%乙醇溶液清洗系统泵和样品泵。

[0116] 5.浓缩:选用截留大小为700KD的中空纤维柱,将纯化后外泌体溶液用中空纤维柱进一步浓缩,浓缩至体积为5ml。

[0117] 对实施例3获得的MSC外泌体的大小和分布进行检测,结果如图12。图12示出了粒径检测外泌体大小和分布。粒径检测结果显示提取的外泌体粒径。

[0118] 对实施例3获得的MSC外泌体外泌体的形态进行检测,结果如图13。参考图13所示的MSC外泌体复合层析电镜图,可以看出完整的外泌体。

[0119] 对比例3hUC-MSC细胞上清的外泌体分离纯化

[0120] 采用超离的方法分离纯化hUC-MSC细胞上清中的外泌体,具体步骤如下:收集的细胞上清液200ml经2000g离心15min,去除死细胞;取上清液经10000g离心30分钟,去除细胞碎片等杂质;取上清液经120000g离心70分钟,可见管底片层沉淀,部分样品会有颜色,此沉淀主要成分即为外泌体;将沉淀用PBS溶液冲洗吹打重悬,再次120000g离心70分钟,小心弃干净上清,除掉一些吸附的杂质,沉淀即为外泌体,沉淀用100 μ L PBS重悬。

[0121] 对比例3获得的MSC外泌体的大小和分布进行检测,结果如图14。图14示出了粒径检测外泌体大小和分布。粒径检测结果显示提取的外泌体粒径分布。

[0122] 对比例3获得的MSC外泌体外泌体的形态进行检测,结果如图15。参考图15所示的血清外泌体超离后电镜图。

[0123] 实施例3与对比例3的MSC外泌体标志性蛋白检测,参考图16所示的MSC外泌体标志

性蛋白检测对比图。从图16中可以看出对比例3和实施例3都可以检测出外泌体的标志蛋白TSG101,平均分子量为46KDa;检测出外泌体的标志蛋白CD81,平均分子量为22KDa;检测出外泌体的标志蛋白CD9,平均分子量在23-27KDa之间。

[0124] 下面结合图表,对上述三个对比例和三个实施例的实验结果总结,具体如下表1所示:

[0125] 表1

[0126]

样品来源		处理体积	纯化方式	粒径数/ml	纯化后体积	总粒径数	每 ml 样品纯化的粒径数
293 细胞 上清	实施例 1	1L	复合层析	1.1×10^{10}	55ml	6.05×10^{11}	6.05×10^8
	对比例 1	200ml	超离	5×10^{10}	100 μ l	5×10^9	2.5×10^7
血清	实施例 2	2ml	复合层析	5.2×10^{10}	7ml	3.64×10^{11}	1.82×10^{11}
	对比例 2	5ml	超离	5.5×10^{10}	100 μ l	5.5×10^9	1.1×10^9
MSC 细胞 上清	实施例 3	2L	复合层析	5.7×10^{10}	5ml	2.85×10^{11}	1.425×10^8
	对比例 3	200ml	超离	4.8×10^9	100 μ l	4.8×10^8	2.4×10^6

[0127] 如表1所示,从本发明的实施例1与对比例1可以看出,本发明实施例的方法可以短时间内处理较大体积(1L)的外泌体待提取液,并且不需要多次重复操作。而对比例1中采用超速离心法一次处理200ml,费时费力,不能实现大规模外泌体提取。且,实施例1的纯化效率是对比例1的20倍以上,表明本发明采用的复合层析的纯化效率要远远高于超离的纯化效率。从本发明的实施例2与对比例2可以看出,本申请实施例还可以处理小体积(2ml)的外泌体待提取液,与对比文件2相比,本发明的复合层析法,即使处理较少的待提取液,也可以获取较大数量的外泌体,且纯化效率也是对比例2的100倍以上,也可以表明本发明实施例的复合层析的纯化效率要远远高于超离的纯化效率。从实施例3和对比例3可以看出实施例3的纯化效率是对比例3的60倍左右,也能够表明本发明实施例的分离外泌体的纯化方法远远优于现有的超离纯化方法。

[0128] 根据本发明实施例的外泌体的纯化方法与超速离心法相比,本发明的方法更节省时间,操作高效便捷,不仅能满足大规模的外泌体需求,也能提取少量的外泌体,获得外泌体的成本低、纯度高并且活性好,还具有操作简单等优点。

[0129] 虽然已参考具体的实施方式描述了本发明,但本领域技术人员将理解,在不偏离本发明的范围下,可进行各种变化,并且等价物可替代其要素。因此,本发明不局限于所公开的具体的实施方式,而是其包括落入所附权利要求范围内的所有实施方式。

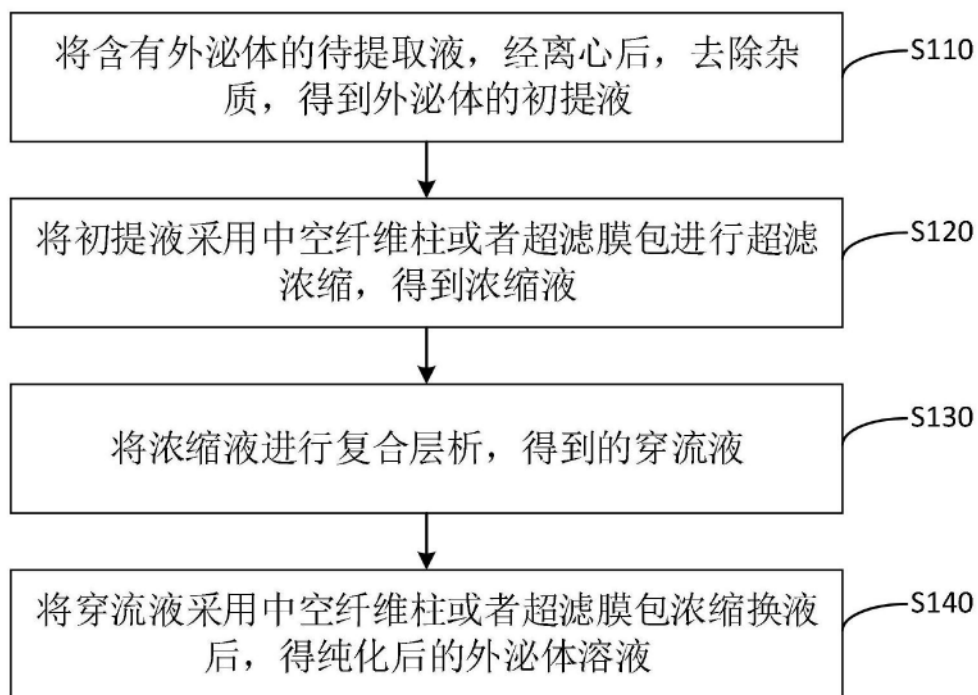


图1

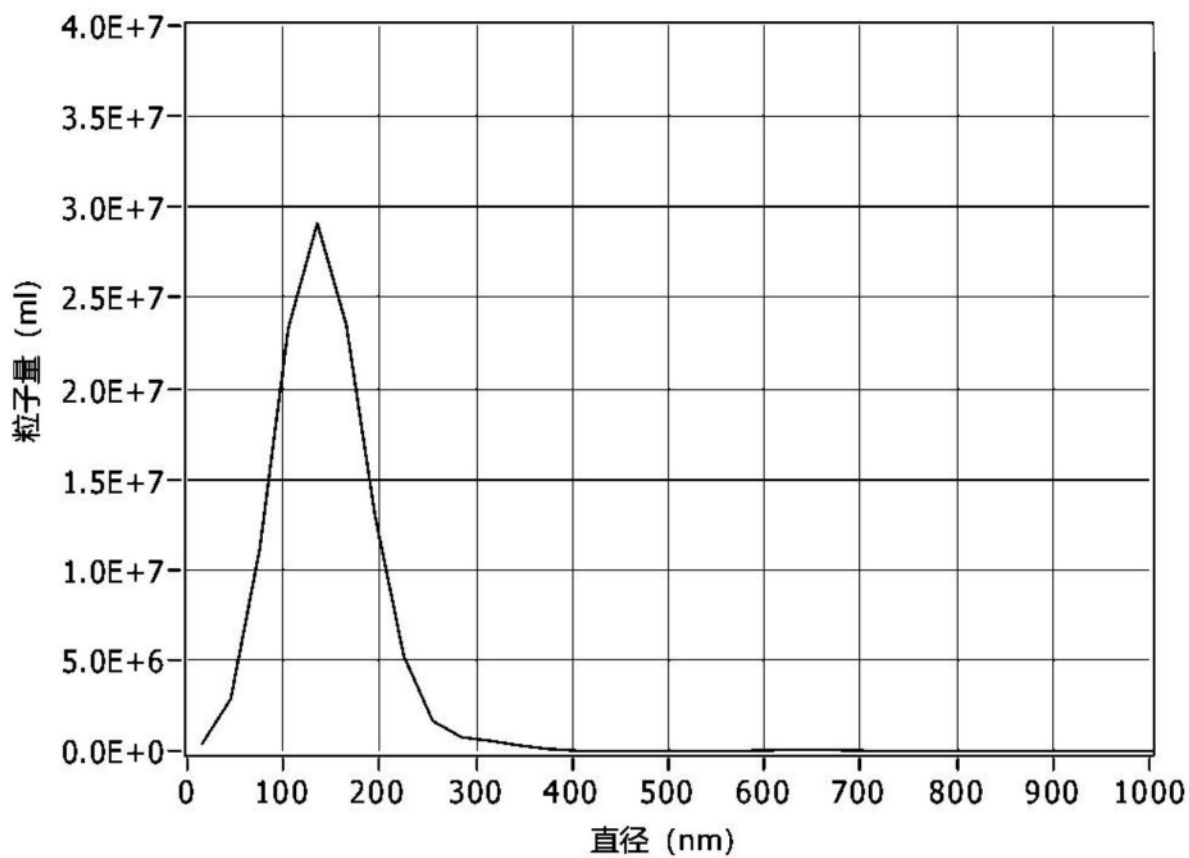


图2

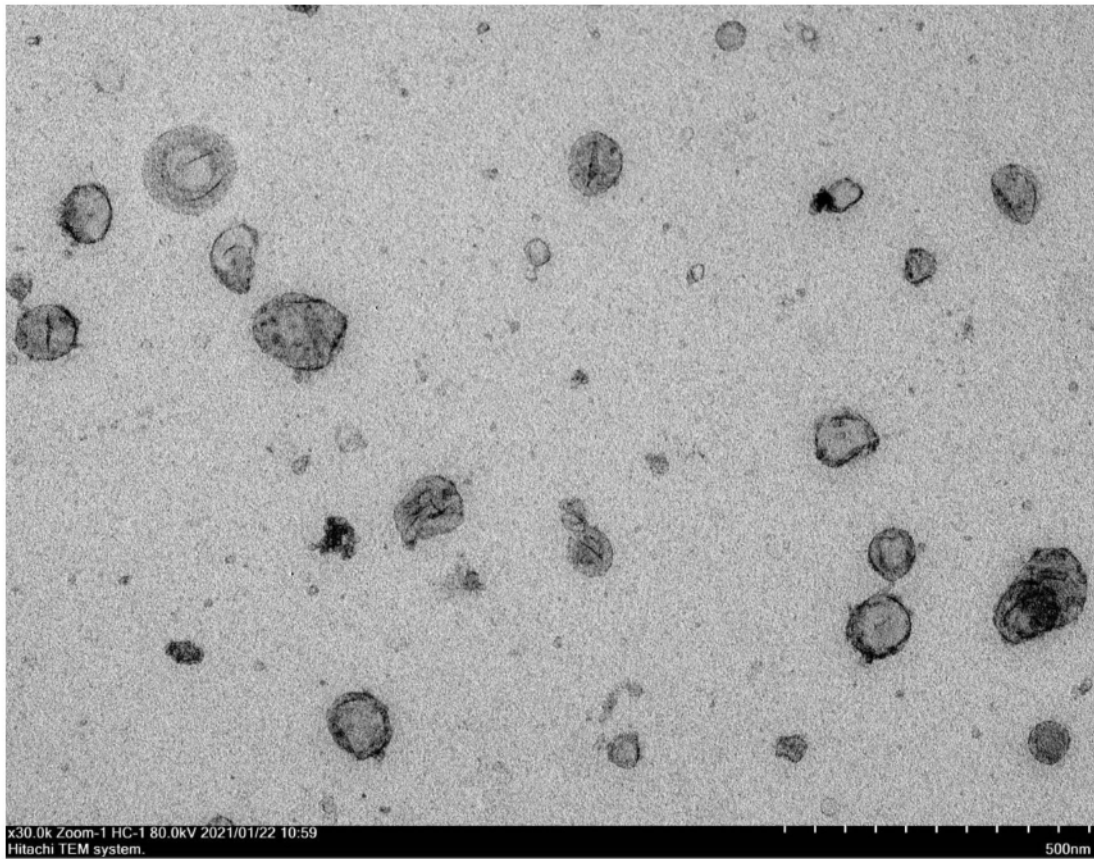


图3

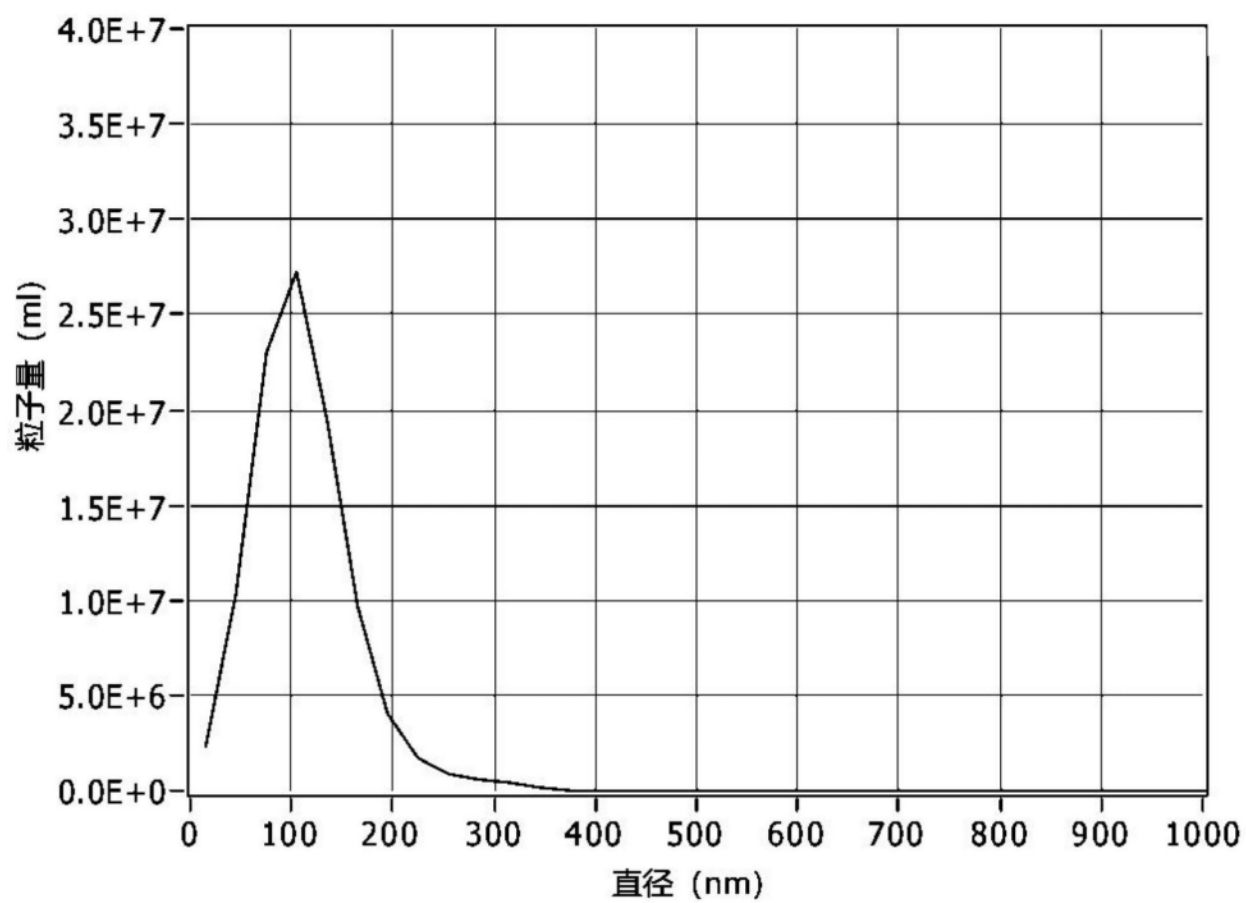


图4

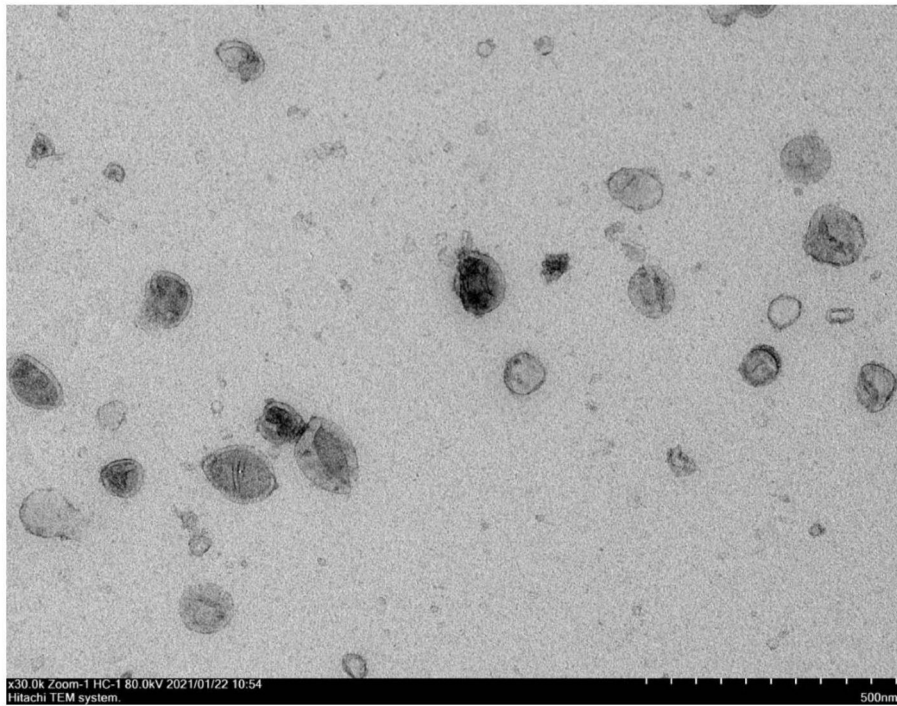


图5

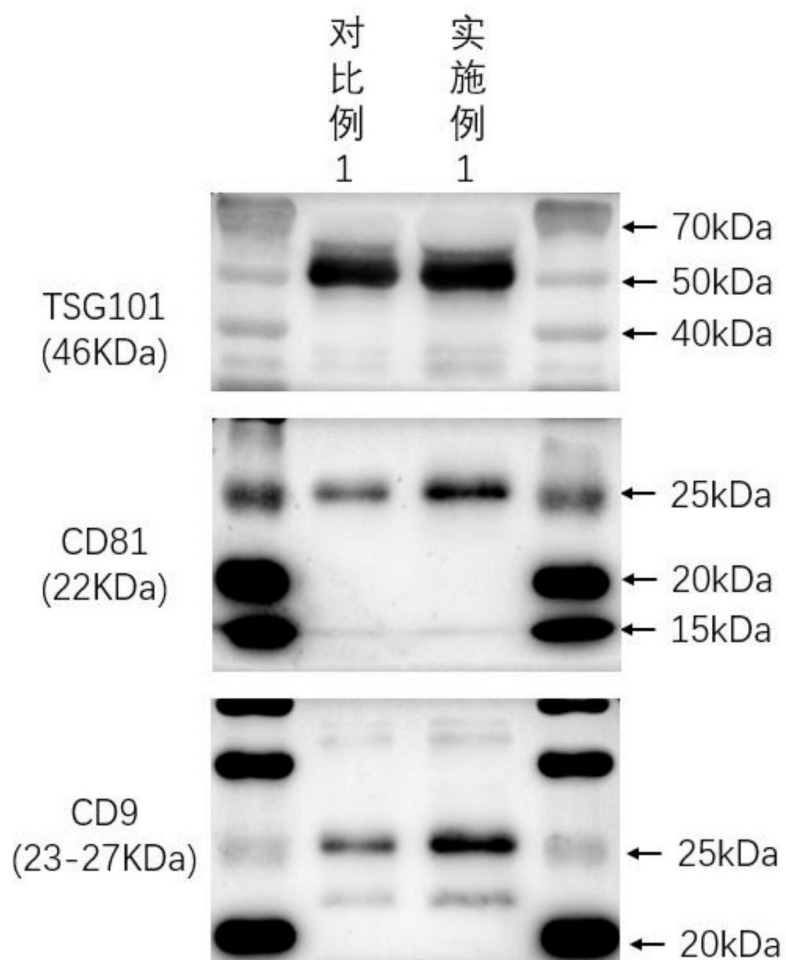


图6

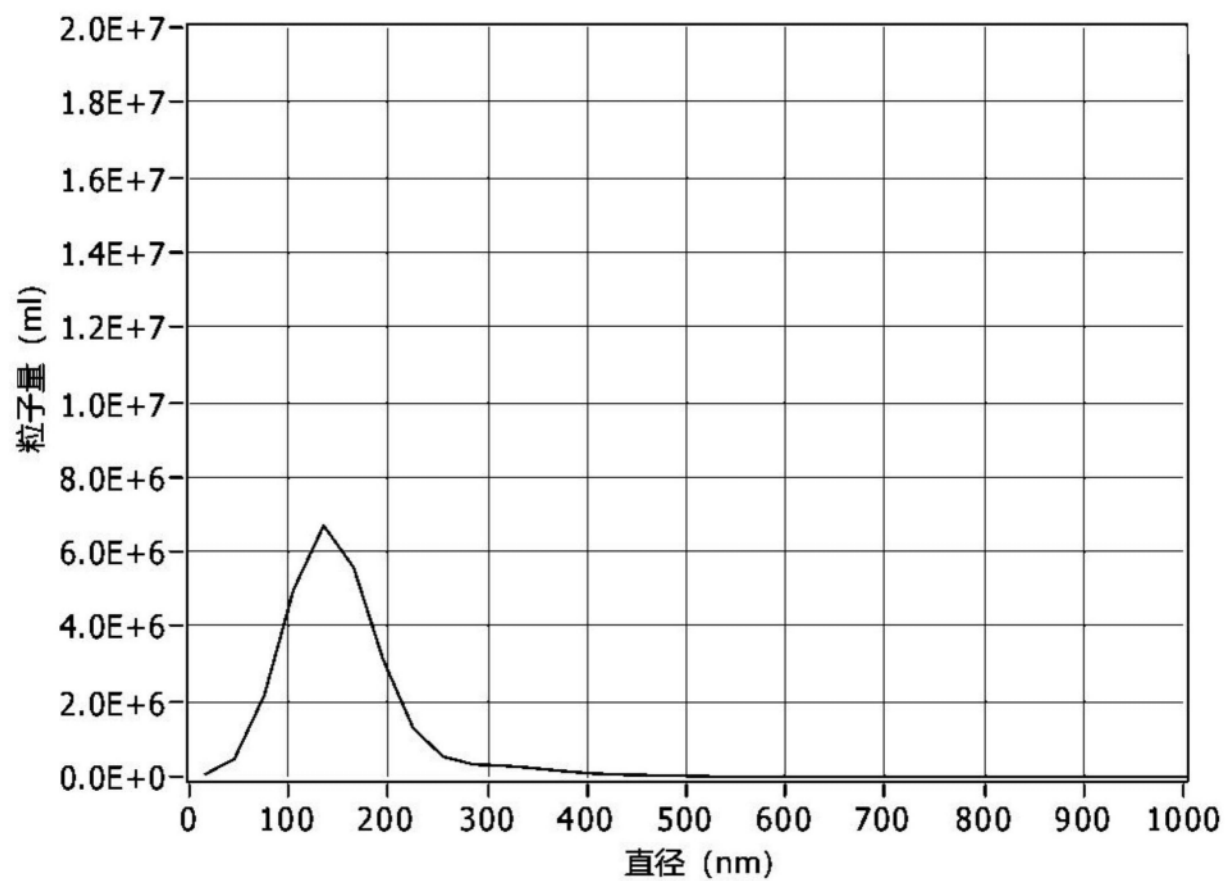


图7

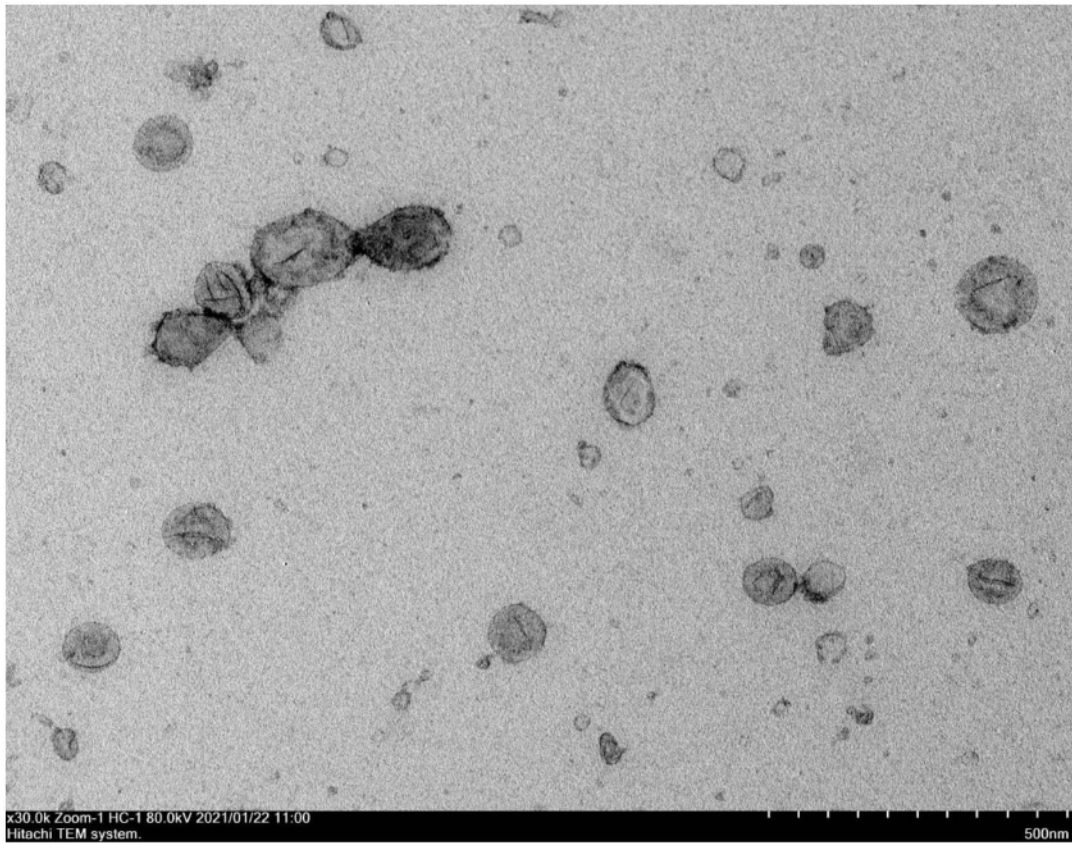


图8

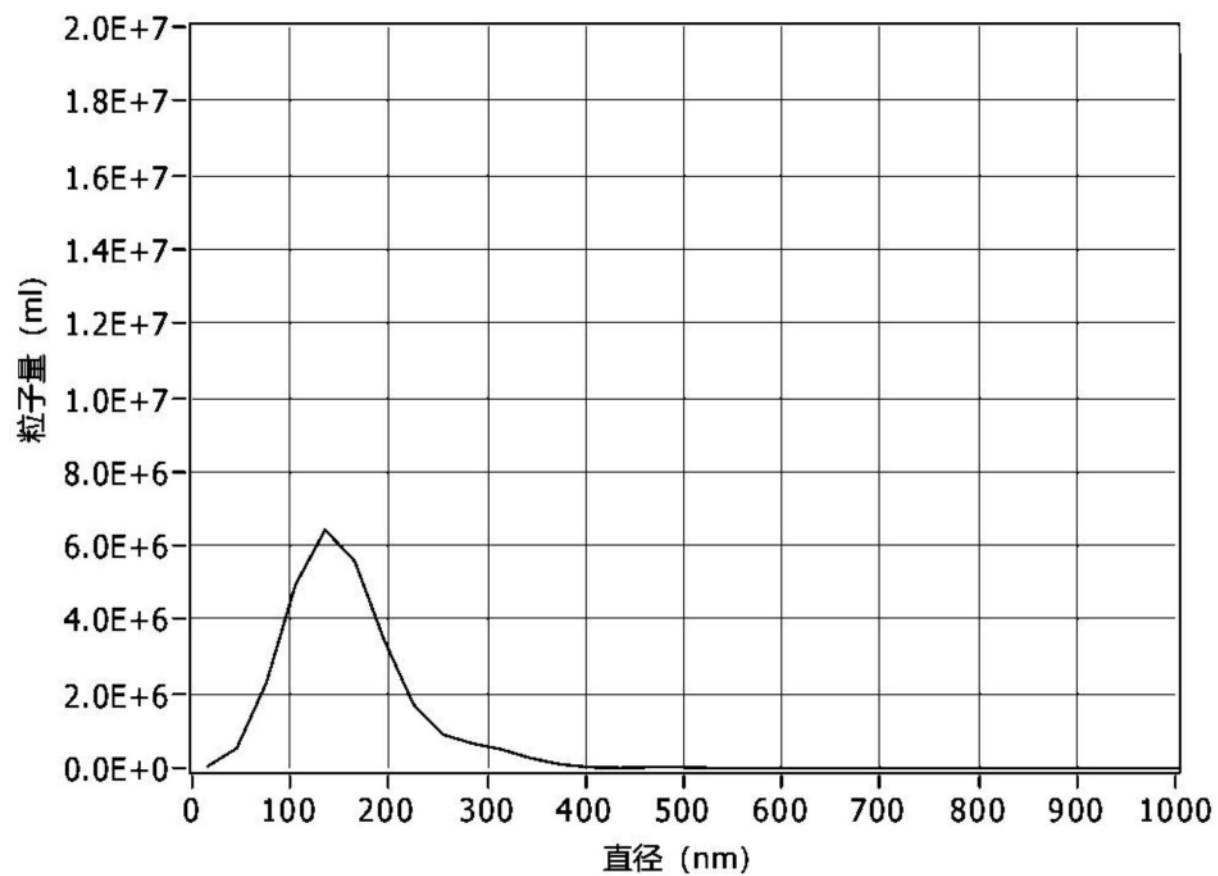


图9

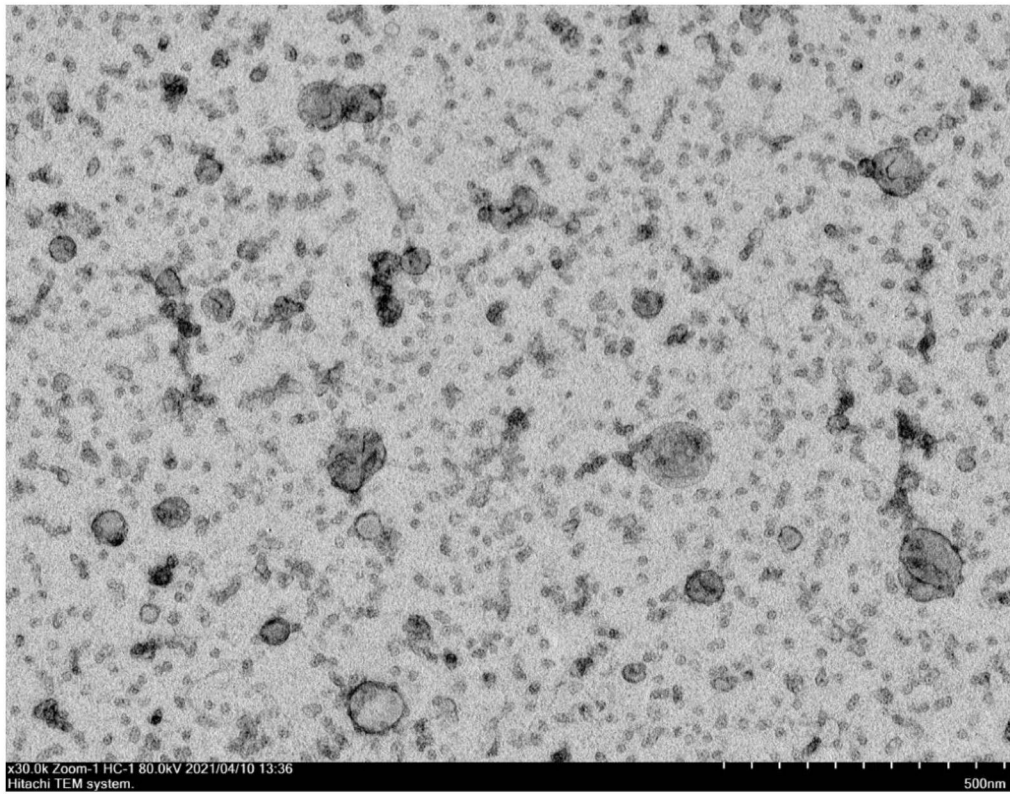


图10

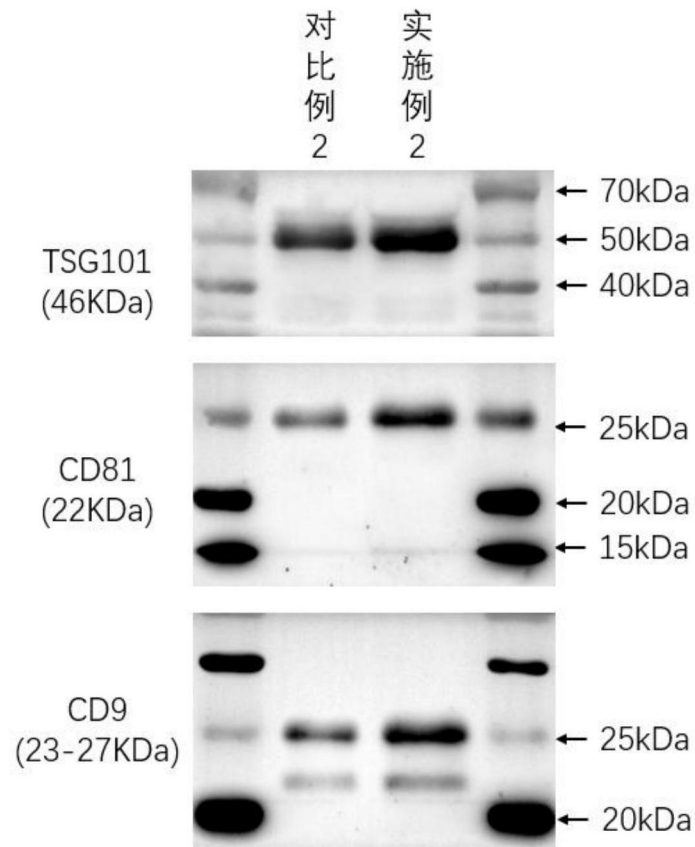


图11

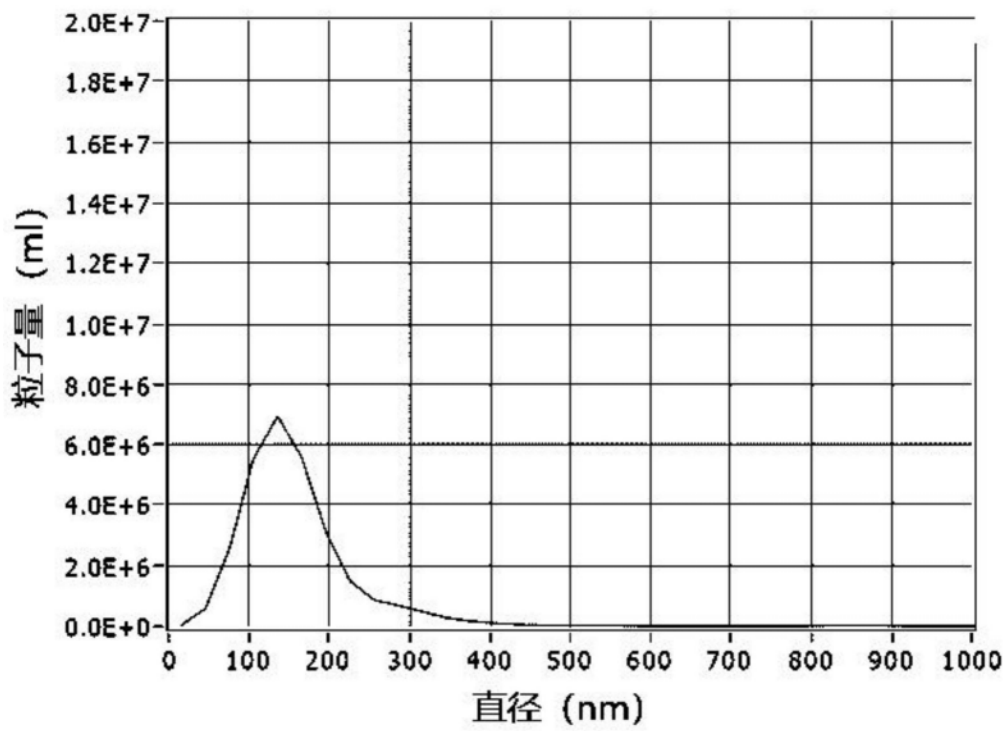


图12

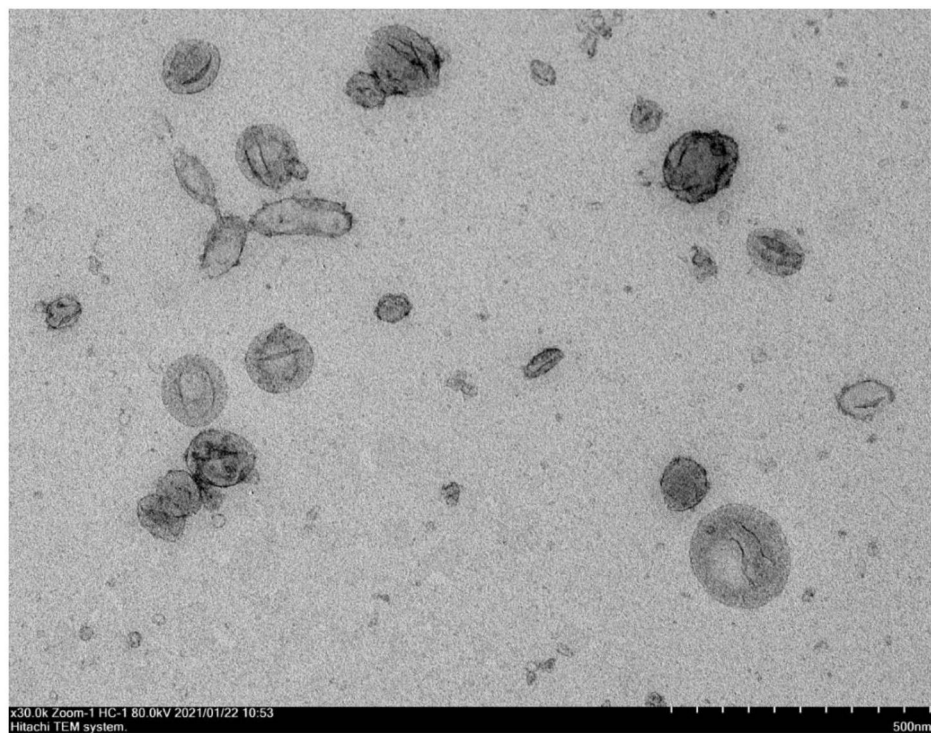


图13

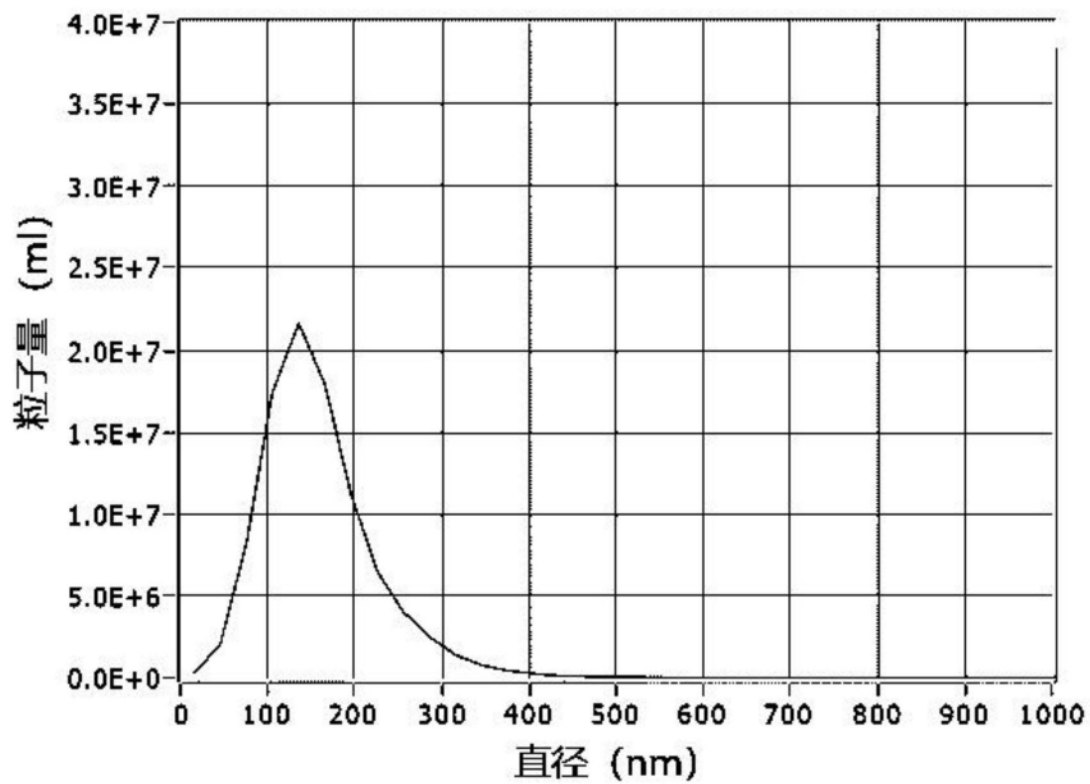


图14

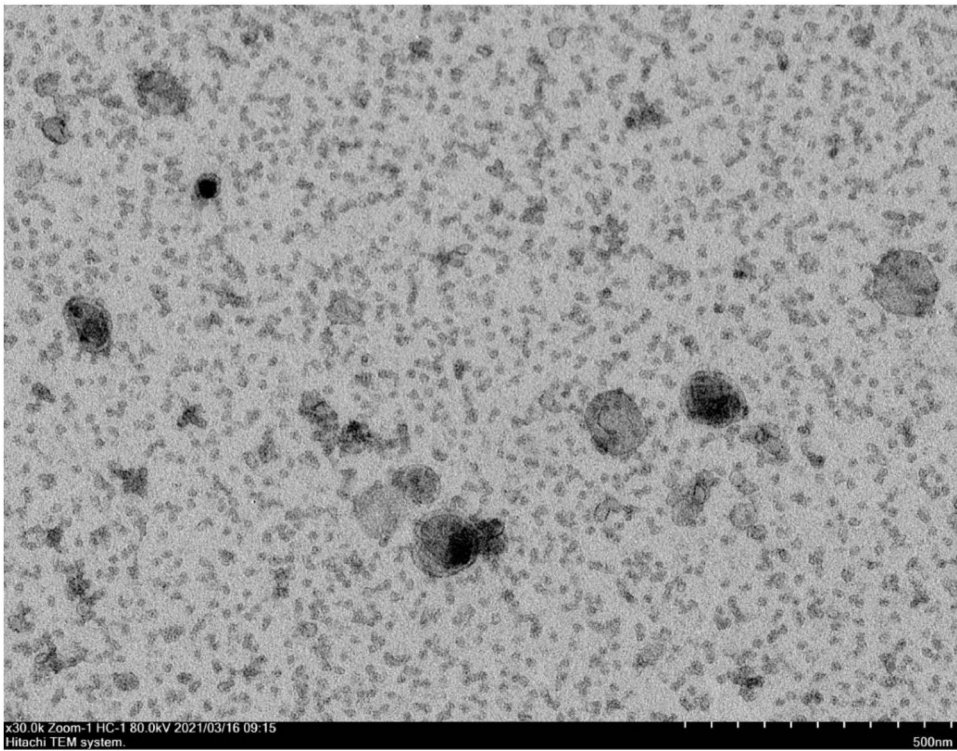


图15

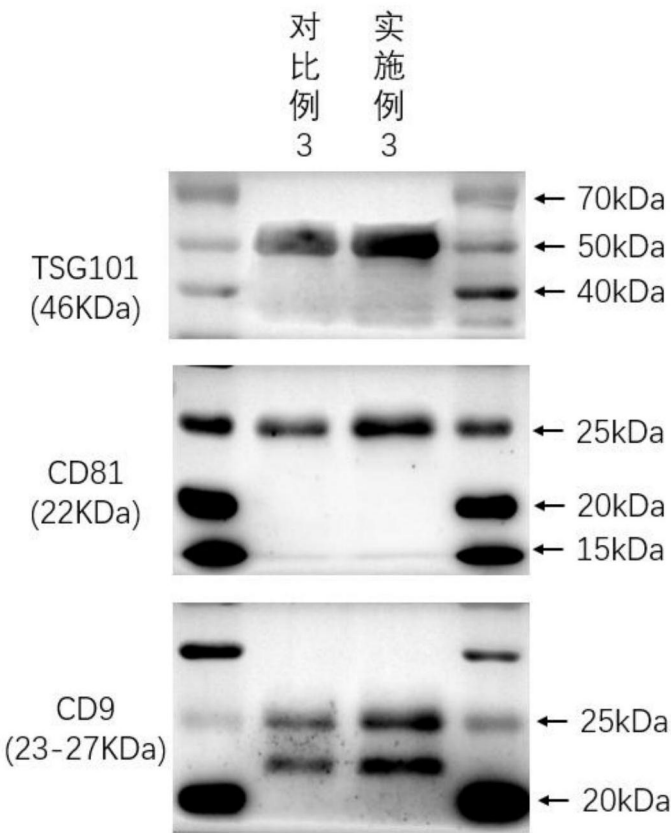


图16