



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109825472 A

(43)申请公布日 2019.05.31

(21)申请号 201910156434.3

C12R 1/19(2006.01)

(22)申请日 2019.03.01

(71)申请人 易春

地址 215028 江苏省苏州市苏州工业园区
星湖街218号苏州生物医药产业园一期A4楼216单元

申请人 方国伟 陆路

(72)发明人 陆路

(74)专利代理机构 杭州千克知识产权代理有限公司 33246

代理人 黎双华

(51)Int.Cl.

C12N 5/078(2010.01)

C12N 5/071(2010.01)

C12N 1/20(2006.01)

权利要求书1页 说明书18页 附图7页

(54)发明名称

一种细胞外囊泡的提取方法及试剂盒

(57)摘要

本发明涉及生物分离提取技术领域,具体涉及一种细胞外囊泡的提取方法。所述方法包括:提供生物样本;在足以使生物样本中杂质部分或全部保留在捕获表面之上的条件下,使所述生物样本经过至少两次与所述捕获表面接触;其中,所述杂质为生物样本中除细胞外囊泡之外的部分或全部的其他物质,所述捕获表面包括球状颗粒多孔材料的内表面和/或外表面;在杂质部分或全部保留在捕获物表面之上时,流穿液即为提取到包含细胞外囊泡的液体;或进一步对上述流穿液进行浓缩。本发明能够快速对细胞外膜囊泡的进行分离纯化,并且该分离操作简单,单次使用成本低,分离样本纯度高,样本生物活性保持良好,应用在生物标志物发现、生物治疗等方面的基础研究与工业生产中。

1. 一种细胞外囊泡的提取方法,其特征在于,所述方法包括:

提供生物样本;

在足以使生物样本中杂质部分或全部保留在捕获表面之上的条件下,使所述生物样本经过至少两次与所述捕获表面接触;其中,所述杂质为生物样本中除细胞外囊泡之外的部分或全部的其他物质,所述捕获表面包括球状颗粒多孔材料的内表面和/或外表面;

在杂质部分或全部保留在捕获物表面之上时,流穿液即为提取到包含细胞外囊泡的液体;

或进一步对上述流穿液进行浓缩。

2. 根据权利要求1所述的一种细胞外囊泡的提取方法,其特征在于,所述方法包括:所述生物样本依次经过两个串联的层析柱后,所述杂质部分或全部保留在层析柱内填料的捕获表面,流穿液即为提取到的纯化后的细胞外囊泡,所述层析柱内填料为球状颗粒多孔材料。

3. 根据权利要求2所述的一种细胞外囊泡的提取方法,其特征在于,所述串联的两个层析柱中第一层析柱内球状颗粒多孔材料的内和外表面为阴离子交换基团官能化,阴离子交换基团为季胺基团或者叔胺基团。

4. 根据权利要求3所述的一种细胞外囊泡的提取方法,其特征在于,所述第一层析柱内球状颗粒多孔材料的内和外表面带正电荷。

5. 根据权利要求2所述的一种细胞外囊泡的提取方法,其特征在于,所述串联的两个层析柱中的第二层析柱内球状颗粒多孔材料内孔表面为阴离子交换基团官能化,阴离子交换基团为季胺基团或者叔胺基团。

6. 根据权利要求5所述的一种小细胞外囊泡的提取方法,其特征在于,所述第二层析柱的球状颗粒多孔材料内孔表面带正电荷。

7. 根据权利要求1或2所述的一种细胞外囊泡的提取方法,其特征在于,所述球状颗粒多孔材料的平均粒径为60-100 μm ,第一层析柱球状颗粒多孔材料的平均孔径小于等于30nm,第二层析柱球状颗粒多孔材料孔径最大排阻分子量小于400KD。

8. 根据权利要求1所述的一种细胞外囊泡的提取方法,其特征在于,细胞外囊泡为外泌体或外膜囊泡。

9. 根据权利要求2所述的一种细胞外囊泡的提取方法,其特征在于,所述生物样本通过层析柱内填料的线性流速为100-480cm/h。

10. 根据权利要求1所述的一种细胞外囊泡的提取方法,其特征在于,所述生物样本包括生物体液、细胞体外培养上清、微生物体外培养上清。

11. 根据权利要求10所述的一种细胞外囊泡的提取方法,其特征在于,所述的生物体液包括血浆/血清、尿液、脑脊液、眼泪、精液、羊水、胃液、唾液、胸水、腹水、鼻涕、支气管肺泡灌洗液、关节滑液、胆汁、子宫粘液和粪便。

12. 根据权利要求2所述的一种细胞外囊泡的提取方法,其特征在于,层析柱内填料的高度为6-35cm。

13. 根据上述任一项权利要求所述的一种细胞外囊泡的提取方法所采用的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒由第一层析柱和第二层析柱串联组成,其中,第一层析柱至少一根,第二层析柱至少一根,层析柱之间采用标准鲁尔接口连接。

一种细胞外囊泡的提取方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物分离提取技术领域,具体涉及一种细胞外囊泡的提取方法及试剂盒。

背景技术

[0002] 细胞外囊泡(extracellular vesicles,EVs)是通过进化保守的途径,由包括从原核生物到更高级的真核生物与植物细胞所释放的一类含膜的囊泡。过去的数十年,细胞外囊泡由于可以转运蛋白、脂类、核酸和糖类进而影响靶向与生成细胞的不同的生理与病理功能,从而被认为是原核与真核生物细胞间交流的重要载体。基于尺寸,细胞外囊泡可以分为小细胞外囊泡(<300nm,small EVs,sEVs)和中大细胞外囊泡>300nm(medium/large EVs,m/lEVs)

[0003] 外泌体(exosomes)是细胞外囊泡的一个亚类,直径为30-150nm属于sEVs,外泌体密度为1.13-1.19g/mL,形成于细胞内的多囊泡体,通过多囊泡体膜与细胞膜融合而释放到细胞外。哺乳动物EVs广泛分布于各种体液中,包括脑脊液、鼻涕、唾液、支气管肺泡灌洗液、关节滑液、胆汁、血液、羊水、精液、尿液、子宫粘液和粪便。体液来源的EVs是来自于体液中的细胞和/或者体液腔内表面细胞的混合物,他们通过脂质膜包裹蛋白核酸等多种生物分子,使其免于体液中相应降解酶的酶解,从而成为生理病理信息来源或者实现细胞间信号的远距离传递。研究人员已发现哺乳动物细胞来源的EVs广泛参与生物系统动态平衡、疾病发展与进展,如神经突出交流和神经再生与退行性变,肿瘤生成和耐药。而sEVs天然的低免疫原性和高度的生物屏障通透性则赋予其成为药物载体的潜力。

[0004] 外膜囊泡(outer membrane vesicles,OMVs)是一类主要源自于原核革兰氏阴性菌的细胞外囊泡,直径在30-300nm。OMVs通过细菌外膜(outer membrane)出芽生成而释放至细胞外,富集了LPS、核酸、脂类、外膜蛋白、周质蛋白、内膜蛋白与胞质蛋白等。一方面,OMVs所富集的分子提示其在治病过程中可能具有重要作用;另一方面,多项研究表明,OMVs有高度的免疫原性,可以在体内同时激活天然或者获得性免疫,具有成为有效疫苗的巨大潜力。

[0005] 无论是用于生物学机制研究的EVs分子检测或者功能分析,还是用于生物标志物发现的核酸蛋白等生物分子检测,或者是用于小分子或者生物大分子的工具载体或者治疗载体的开发,足量生物活性保持良好的高纯度EVs都是最底层的需求。因此,EVs提取方法对EVs研究和应用开发领域都具有相当重要的影响。

[0006] 目前外泌体的提取常用如下几种方式:

[0007] 一是超速离心法,主要包括差速离心和密度梯度离心,这是目前EVs提取最常用的方法之一。差速离心法虽然操作简单,但操作费时(2-3hr),分离产物纯度低,外泌体回收率较低,分离量放大受限,且需要配制昂贵的超速离心机;密度梯度离心则需要预先完成差速离心浓缩,虽然纯度高,但除去前述的缺点外,操作繁琐,更加费时(>16hr)。

[0008] 二是多聚物沉淀法,该方法由多聚物(如PEG)与疏水性蛋白和脂质分子结合共沉

淀, 早先应用于从血清等样本中收集病毒。EVs分离操作简单, 成本低廉, 但一般需过夜操作, 耗时较长, 且最大的问题仍然是纯度低, 有大量蛋白和核酸杂质被共沉淀。

[0009] 三是超滤法, 该方法操作简单, 但外泌体受机械剪切力大, 可能影响外泌体的生物活性和结构, 且纯度更加不足, 更多的是起到富集而不是纯化提取的作用。

[0010] 四是免疫亲和法, 该方法特异性高、操作简单、无需昂贵的仪器设备, 但由于目前仍未发现EVs通用标志物, 一般所使用的特异性抗体尽可以识别EVs亚群, 同时实验试剂成本相对较高, 且不利于分离规模放大。

[0011] 五是PS亲和法, 该方法将PS (磷脂酰丝氨酸) 与磁珠结合, 利用亲和原理捕获EVs的PS。该方法与免疫亲和法相似, 获得的外泌体形态完整, 纯度较高。由于不使用变性剂, 不影响外泌体的生物活性, 外泌体可用于细胞共培养和体内注射。2016.9《Scientific Reports》杂志发表了该方法最新数据, 表明PS法可提取相当高纯度的外泌体。但该方法仍然存在分离规模放大以及使用成本的问题。

[0012] 六是分子排阻色谱法, 该方法利用根据凝胶孔隙的孔径大小与样品EVs尺寸的相对关系而对溶质进行分离。样品中大于孔径的分子和EVs不能进入凝胶孔, 只能沿多孔凝胶粒子之间的空隙通过色谱柱, 首先流出; 小分子量杂质则可进入凝胶中绝大部分孔洞, 在柱中受到更强地滞留, 更晚地流出。此法所分离到的外泌体在电镜下大小均一, 但是分离样本体积较少, 流速慢导致分离时间相对较长, 样本稀释至少5-6倍, 分离规模放大有一定限制, 有效的使用且需要特殊的设备, 且无法区分与细胞外囊泡大小相近的颗粒物质。应用相对受限。

[0013] 七、其他方法, 包括微流控场流分离等在内方法, 也都处于早期的开发阶段存在分离样本少, 对下游检测方法灵敏度有较高的要求。

[0014] 综上所述现有的细胞外囊泡分离方法, 主要存在, 操作繁琐耗时长、分离纯度低、分离规模无法线性放大, 使用成本高昂的问题。

[0015] 如, 公开号为108865983A、公开日为2018-11-23的发明专利, 公开了一种细胞外泌体的提取方法, 该方法包括以下步骤: (1) 上清液分离: 将细胞培养后的培养基, 离心去除杂质, 分离出培养上清液; (2) 一次提取: 将步骤(1)所述培养上清液与外泌体提取液混合后进行孵育, 孵育后得第一孵化液, 对第一孵化液进行离心浓缩, 得到含外泌体的浓缩液; (3) 二次提取: 将步骤(2)所述含外泌体的浓缩液加入无菌PBS溶解后加入外泌体提取液进行孵育, 孵育后得第二孵化液, 将第二孵化液进行离心收集底部沉淀, 得细胞外泌体。该专利仍然是采用了多聚物沉淀离心提取, 不可避免地存在上文所述的多聚物沉淀离心提取所存在的问题。

[0016] 另外其他目前公开了的专利也均采用了上述的方法之一, 存在了相应的问题。

发明内容

[0017] 本发明的目的是为了解决上述问题, 提供一种外泌体的提取方法。

[0018] 为了达到上述发明目的, 本发明采用以下技术方案:

[0019] 一种细胞外囊泡的提取方法, 所述方法包括:

[0020] 提供生物样本;

[0021] 在足以使生物样本中杂质部分或全部保留在捕获表面之上的条件下, 使所述生物

样本经过至少两次与所述捕获表面接触；其中，所述杂质为生物样本中除细胞外囊泡之外的部分或全部的其他物质，所述捕获表面包括球状颗粒多孔材料的内表面和/或外表面；

[0022] 在杂质部分或全部保留在捕获物表面之上时，流穿液即为提取到包含细胞外囊泡的液体；

[0023] 或进一步对上述流穿液进行浓缩。

[0024] 优选的，所述方法包括：所述生物样本依次经过两个串联的层析柱后，所述杂质部分或全部保留在层析柱内填料的捕获表面，流穿液即为提取到的纯化后的细胞外囊泡，所述层析柱内填料为球状颗粒多孔材料。

[0025] 优选的，所述串联的两个层析柱中第一层析柱内球状颗粒多孔材料的内和外表面为阴离子交换基团官能化，阴离子交换基团为季胺基团或者叔胺基团。如 $-N^+(CH_3)_3$ 或 $-O-CH_2COO^-$ 或 $-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CHOHCH_2N^+(CH_3)_3$ 。

[0026] 优选的，所述第一层析柱内球状颗粒多孔材料的内和外表面带正电荷。

[0027] 优选的，所述串联的两个层析柱中的第二层析柱内球状颗粒多孔材料内孔表面为阴离子交换基团官能化，阴离子交换基团为季胺基团或者叔胺基团。如 $CH_3(CH_2)_7NH^-$ 。

[0028] 优选的，所述第二层析柱的球状颗粒多孔材料内孔表面带正电荷。

[0029] 优选的，所述球状颗粒多孔材料的平均粒径为60-100 μm ，第一层析柱球状颗粒多孔材料的平均孔径小于等于30nm，第二层析柱球状颗粒多孔材料孔径最大排阻分子量小于400KD。

[0030] 优选的，细胞外囊泡为外泌体或外膜囊泡。

[0031] 优选的，所述生物样本通过层析柱内填料的线性流速为100-480cm/h。

[0032] 优选的，所述生物样本包括生物体液、细胞体外培养上清、微生物体外培养上清。

[0033] 1. 优选的，所述的生物体液包括血浆/血清、尿液、脑脊液、眼泪、精液、羊水、胃液、唾液、胸水、腹水、鼻涕、支气管肺泡灌洗液、关节滑液、胆汁、子宫粘液和粪便。

[0034] 优选的，层析柱内填料的高度为6-35cm。

[0035] 一种细胞外囊泡的提取方法所采用的试剂盒，所述试剂盒由第一层析柱和第二层析柱串联组成，其中，第一层析柱至少一根，第二层析柱至少一根，层析柱之间采用标准鲁尔接口连接。

[0036] 本发明中采用至少两个层析柱，当采用两个层析柱时，生物样本以较快的线性流速流经第一层析柱时，小于填料孔径的杂质进入填料内部被部分吸附，大于填料孔径的杂质被表面吸附，外泌体大于填料孔径直接流穿；第一柱流穿液以同样的线性流速流经第二柱时，小于孔径的杂质进入填料内部被吸附，而sEVs直接流穿。

[0037] 目前采用离子交换层析法进行生物物质分离通常是将需要的物质进行吸附捕捉，而本申请是采用流穿液的形式。也就是说，通常的离子交换层析分离方法是通过将目的物质进行吸附，杂质流穿，然后再洗脱，而本申请的方法则是吸附杂质，让目的物质流过，因此，流穿液即为含有目的物质的混合液。如，目前的蛋白和病毒纯化。而本发明创造性地利用层析柱的流穿模式，对sEVs进行分离提取。

[0038] 如果采用膜层析来提取的话，就无法开发成流穿式，这是由于sEVs和OMVs相对于膜的流动，要么是被截留于膜的一侧，要么是流穿过膜至另一侧。sEVs和OMVs分别为30-150nm和10-300nm非均一的纳米级囊泡，如果层析膜孔径大于sEVs或OMVs上限，使sEVs或

OMVs流穿过层析膜,那么sEVs或OMVs则会在流体压力的驱动下全部穿过膜,在穿膜过程中,sEVs或OMVs将会全部与膜内孔道内表面正电荷基团结合而大量被吸附,分离sEVs或OMVs则只能采用结合洗脱模式;而结合洗脱模式中,不可避免地,其洗脱过程需要用高盐,而高盐会破坏囊泡,影响生物活性。如果层析膜孔径小于sEVs或OMVs下限,则无论是切向流或者死端流动,sEVs或OMVs都将无法直接流穿层析膜而变为可直接收集,而是被层析膜截留在另一侧。

[0039] 现有的针对外泌体以及外膜囊泡的分离方法,其分离速度慢:常规的差速离心的一个30ml的样本需要至少分离2-3小时,密度梯度离心时间更长;而超速离心设备价格昂贵,一般价值在30万-100万人民币;本发明采用的方法进行分离,同样的量,最快只需要不到5分钟,而设备要求相对低得多。再没有FPLC的情况下可以使用普通柱塞泵或者蠕动泵。通常超速分离一般一次分离6个样本,单个体积在10-40ml,虽然最高可达250ml,但无法再继续扩大,且需要单独配置价格昂贵的离心转子。。

[0040] 目前针对外泌体或者外膜囊泡的分离提取方式,包括分子筛分离柱,但是该方式也存在着分离量较小,分离操作效率较低的问题。

[0041] 在目前整个EVs纯化的领域(基础研究和应用市场上),现有的问题是:纯化的纯度、纯化操作周期和规模,以及工艺的周期成本的问题。

[0042] 本发明采用上述的方法,可以以较低的成本,达到较高的处理量,达到提高了处理效率。

[0043] 本申请采用了两个层析柱串联,该层析柱具有符合孔径和表面电荷的的填料,按照常规的方法装填,满足相应的柱高,使用时,采用相应的流速。采用两层层析柱,效果是,第一个层析柱做初步纯化,第二个层析柱做中效/精细纯化,目的是得到可以用于临床的外泌体,足够纯。

[0044] 而我们的方法是EVs流经柱层析填料时,由于EVs大于填料孔径而只流经颗粒填料间的空隙,仅与第一柱颗粒填料外表面的荷电基团结合,在较高的流速下达到去除大杂质外,减少EVs损失。

[0045] 柱一的填料为离子交换填料杂质的负载能力是第二柱填料的10倍。而柱二填料建议的柱高至少为10cm,通过增加串联的柱一不仅增加了去除超大分子杂质的性能,同时也弥补了缩短柱二所带来的性能衰减。

[0046] 本发明与现有技术相比,有益效果是:本发明能够快速对细胞外囊泡(如多种体液以及体外培养细胞的外泌体或者微生物培养液中的外膜囊泡)进行分离纯化。该分离操作简单,单次使用成本低,分离样本纯度高,样本生物活性保持良好,能够在生物标志物发现、生物治疗等基础研究与诊断及生物治疗药物生产中应用。

附图说明

[0047] 图1是本发明的实施例1的分离小鼠血浆来源外泌体样本标志物CD63、CD9和TSG101的WB检测结果图;

[0048] 图2是本发明的实施例1的分离小鼠血浆来源外泌体样本标志物CD63、CD9和TSG101的透射电镜形态图;

[0049] 图3是本发明的实施例1的分离小鼠血浆来源外泌体样本标志物CD63、CD9和

TSG101的纳米颗粒追踪检测粒径分布图；

[0050] 图4本发明实施例2分离人尿液来源外泌体样本标志物CD63、TSG101和CD9的WB检测结果图，

[0051] 图5本发明实施例2分离人尿液来源外泌体样本标志物CD63、TSG101和CD9的透射电镜形态图；

[0052] 图6本发明实施例2分离人尿液来源外泌体样本标志物CD63、TSG101和CD9的纳米颗粒追踪检测粒径分布图；

[0053] 图7本发明实施例3分离大肠杆菌培养上清来源OMV样本透射电镜形态图；

[0054] 图8本发明实施例3分离大肠杆菌培养上清来源OMV样本的纳米颗粒追踪检测粒径分布图；

[0055] 图9本发明实施例4分离293T细胞培养上清来源外泌体样本标志物CD63、CD9、TSG101、ANXA2和Syntenin以及细胞内组分蛋白标志GM130和Alix的WB检测结果图，

[0056] 图10本发明实施例4分离293T细胞培养上清来源外泌体样本标志物CD63、CD9、TSG101、ANXA2和Syntenin以及细胞内组分蛋白标志GM130和Alix的透射电镜形态图，

[0057] 图11本发明实施例4分离293T细胞培养上清来源外泌体样本标志物CD63、CD9、TSG101、ANXA2和Syntenin以及细胞内组分蛋白标志GM130和Alix的纳米颗粒追踪检测粒径分布图；

[0058] 图12是本发明的方法所采用的试剂盒的结果示意图。

[0059] 图12中，1是第一层析柱，2第二层析柱，3标准鲁尔接口。

具体实施方式

[0060] 下面通过具体实施例对本发明的技术方案作进一步描述说明。

[0061] 如果无特殊说明，本发明的实施例中所采用的原料均为本领域常用的原料，实施例中所采用的方法，均为本领域的常规方法。

[0062] 如图12所示，是本发明的提取方法所用的提取装置即试剂盒的结构示意图。

[0063] 如图所示，该试剂盒由第一层析柱1和第二层析柱2串联组成，其中，第一层析柱至少一根，第二层析柱至少一根，层析柱之间采用标准鲁尔接口3连接。

[0064] 在第一层析柱1和第二层析柱2上设置上接头和下接头；

[0065] 上接头：一头为公鲁尔接口，一头为M6外螺纹或内螺纹；

[0066] 下接头：一头为母鲁尔接口，一头为1/16外螺纹或内螺纹。

[0067] 使用方法：

[0068] 1、将第一层析柱和第二层析柱，自上而下顺次通过鲁尔接口连接成为EV纯化柱，注意排出接口处的空气；

[0069] 2、

[0070] A. 使用AKTA等FPLC设备时，将EV纯化柱上入口和下出口分别通过配件（即转接头，如1/16英寸外螺纹转鲁尔公接头、3/16内螺纹转鲁尔母接头）与FPLC连接，注意接口处气密性和空气排出；

[0071] B. 使用蠕动泵或者柱塞泵时，将EV纯化柱上入口顺次通过配件与泵出口管路连接，配件如宝塔头-鲁尔公转接头、内径宝塔头-鲁尔母转接头；将泵入口管路通过配件1（二

位三通手动转接头)分别与上样容器和层析缓冲液容器连接。

[0072] 如上形成畅通的流路,排空流路内空气后,即可开始分离EV。

[0073] 实施例1:

[0074] 一种小鼠血液来源的外泌体纯化的使用方法,步骤如下(具体结果结合图1-图3):

[0075] (1) 外泌体纯化用液体准备

[0076] a. 配制平衡缓冲液(PBS, pH7.2), 0.025 μ m混合纤维素酯(MCE)真空抽滤,平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;

[0077] b. 配制洗涤缓冲液(2M NaCl, 1M NaOH, 30%异丙醇), 0.025 μ m混合纤维素酯(MCE)真空抽滤,平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;

[0078] d. ddH₂O 0.025 μ m混合纤维素酯(MCE)真空抽滤,平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;

[0079] e. 配制保存液20%乙醇, 0.1 μ m混合纤维素酯(MCE)真空抽滤,平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;

[0080] (2) 小鼠血浆制备

[0081] a. 无菌条件下,使用3ml规格3.2%枸橼酸钠抗凝真空采血管,自8周龄雄性SPF级昆明小鼠采集血液,共计约21ml;

[0082] b. 血液采集后,即刻轻柔充分混匀,抗凝血置于22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C环境暂存小于1小时;

[0083] c. 于血液采集1小时内,3000rpm 4 $^{\circ}$ C离心15min,采集约12ml上清血浆。

[0084] (3) 小鼠血浆样本外泌体纯化前处理

[0085] a. 确认样本无溶血后,0.45 μ m PES膜微孔过滤器过滤血浆样本,收集约11ml过滤血浆;

[0086] b. 使用冰浴预冷的Tri-HCl, pH8.0缓冲液1:2.5稀释10ml过滤血浆;

[0087] c. 0.22 μ m PES膜微孔过滤器过滤稀释血浆样本,收集约24ml过滤稀释血浆,稀释血浆于4 $^{\circ}$ C层析柜中平衡10分钟后,用于下游外泌体纯化。

[0088] (4) 小鼠血浆来源外泌体纯化

[0089] a. 将分离柱A和分离柱B通过鲁尔接口上下直接串联;

[0090] b. 通过上转接头与下转接头将串联的分离柱柱连接至放置于4 $^{\circ}$ C的层析柜中的AKTA pure (FPLC);

[0091] c. 启动FPLC,保持反压阀关闭,使用ddH₂O以自40cm/h逐步提升至500cm/h流速反向流过层析柱,测试并确认流路无渗漏,直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处显示排尽系统内空气;

[0092] d. 使用ddH₂O以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处;

[0093] e. 使用Tri-HCl, pH8.0以100cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定;

[0094] f. 通过A泵经A1通路以100cm/h线性流速开始上样经稀释的小鼠血浆10.5ml,并收集流穿液,流穿液即为纯化后小鼠血浆来源外泌体;

[0095] g. 取10ml外泌体样本加入15ml 10KD超滤管(Millipore),5000g室温离心20分钟;

[0096] h. 收集外泌体浓缩液约1ml,即可用于外泌体鉴定检测。

[0097] i. 使用再生液(2M NaCl, 1MNaCl、30%异丙醇)以40cm/h流速反向冲洗分离柱5分

钟,静置15min,再反向40cm/h流速反向冲洗分离柱10分钟;

[0098] j.使用ddH₂O以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处;

[0099] k.重复e-h步骤,收集外泌体浓缩液共计约2ml,用于-20摄氏度冻存和直接下游分析与样本检测。

[0100] l.不再使用的分离柱,使用再生液(2M NaCl、1MNaOH、30%异丙醇)以40cm/h流速反向冲洗分离柱5分钟,静置15min,再反向40cm/h流速反向冲洗分离柱10分钟;

[0101] m.使用ddH₂O以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处;

[0102] n.使用20%乙醇以100cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处;

[0103] o.自FPLC取下分离柱,并将分离柱上下口使用原堵头密封,放置于4度保存。

[0104] (5)小鼠血浆来源外泌体鉴定

[0105] A.透射电镜检测分离的小鼠血浆外泌体形态

[0106] a.吸取255μl外泌体样本至1.5ml EP管中,震荡混匀器震荡EP管,逐滴加入255μl已平衡至室温的8%多聚甲醛溶液;

[0107] b.混合样本,12000rpm室温瞬时离心5s,室温静置孵育10min;

[0108] c.吸取500μl样本至0.5ml 10KD超滤管(Millipore),14000g,4℃离心25min,弃去滤出液;

[0109] d.吸取450μl ddH₂O至0.5ml 10KD超滤膜,14000g,4℃离心25min,弃去滤出液;e.重复步骤d一次;

[0110] f.去除超滤管中滤膜组件,反插入新的配套EP管中,2000g 4℃离心2min,收集浓缩外泌体,约50μl;

[0111] g.自电镜铜网盒中,使用电镜用自锁弯头镊取出200目覆碳膜电镜铜网,将碳膜一侧向上,将镊子侧转水平放置于实验台白色定性滤纸上;

[0112] h.吸取10μl浓缩外泌体样本,滴加至铜网碳膜上,室温静置1min;

[0113] i.直头尖镊夹取剪裁为小块的慢速定量滤纸,垂直夹取,自镊子加持位置吸干铜网液体;

[0114] j.吸取10μl ddH₂O,轻柔滴加至铜网碳膜上后立即吸去(如步骤i);

[0115] k.吸取10μl 1%醋酸双氧铀染液,轻柔滴加至200目电镜铜网碳膜一侧,室温静置1min,迅速吸取染液;

[0116] l.将铜网静置于红外灯下,距离约20cm,铜网照射干燥5min;

[0117] m.重复步骤g-l两次,制作平行电镜样本2个;

[0118] n.次日,使用透射电镜(FEI Tecnai G2Spirit)观察并记录分离的小鼠血浆来源外泌体样本。

[0119] B.激光纳米追踪技检测分离的小鼠血浆来源外泌体粒径分布

[0120] a.吸取750μl外泌体浓缩液至4ml EP管中,震荡混匀器震荡EP管,逐滴加入750μl已平衡至室温的8%多聚甲醛溶液;

[0121] b.混合样本EP管12000rpm室温瞬时离心10s,室温静置孵育10min;

- [0122] c.使用50ml注射器向5ml HiTrap Sephadex脱盐柱缓慢推注(约2滴/秒) 25ml ddH₂O以进行柱平衡;
- [0123] d.使用2ml注射器,向脱盐柱推注1.5ml浓缩外泌体样本,收集约2ml流出液;
- [0124] e.流出液即为处于ddH₂O中的固定外泌体。
- [0125] f.样本使用ddH₂O 2倍梯度稀释外泌体样本分别为1:2、1:5、1:10、1:20倍,上机检测(Particle Metrix),取最佳稀释度值为检测结果。
- [0126] C.外泌体相关蛋白免疫印迹检测
- [0127] I样本制备
- [0128] a.吸取500μl样本至0.5ml 10KD超滤管(Millipore),14000g,4℃离心25min,弃去滤出液;
- [0129] b.重复步骤a一次将全部外泌体浓缩液进一步浓缩值总体积约80μl;
- [0130] c.向外泌体样本中加入20μl 5X loading buffer(Thermo),震荡混匀;
- [0131] d.样本于带热盖金属浴中95℃加热5min,冷却至室温备用;
- [0132] e.细胞刮刮取常规培养汇集度约60%HeLa细胞作为检测阳性样本,用2ml冰浴预冷PBS重悬细胞并等量转移至两个1.5ml EP管中;
- [0133] f.细胞样本200g 4℃离心10min,弃尽上清;
- [0134] g.向每个EP管的沉淀中分别加入300μl预冷RIPA(含蛋白酶抑制剂cocktail),充分吹打细胞沉淀;
- [0135] h.EP管4℃混匀孵育30min,合并于1个1.5ml EP管中;
- [0136] i.样本冰浴超声破碎2-3秒,以切断释放的gDNA并进一步破碎未充分破碎细胞及细胞碎片;
- [0137] j.细胞样本12000rpm 4℃离心30min,保留上清约600μl;
- [0138] k.吸取400μl细胞裂解液上清,加入100μl 5X loading buffer(Thermo),震荡混匀;
- [0139] l.样本于带热盖金属浴中95℃加热5min,冷却至室温备用;
- [0140] II免疫印迹检测
- [0141] a.HeLa细胞裂解液为阳性样本(PC)上样与外泌体样本等体积上样20μl,15%SDS-PAGE(CD63\CD9) 80V电泳30min,10%SDS-PAGE(TSG101) 80V电泳30min;120V电泳至缓冲液染料距电泳胶下缘约0.5cm;
- [0142] b.0.22μm PVDF膜(PALL) 90V湿法转膜;
- [0143] c.5%脱脂奶粉/TBST室温摇床孵育1hr;
- [0144] d.3%BSA/TBST稀释抗CD63抗体(Abcam,1:2000)、CD9(Abcam,1:2000)、TSG101(Abcam,1:2000),4℃震荡孵育过夜;
- [0145] e.抗CD63抗体使用抗鼠二抗(Jackson Immunoresearch),抗CD9抗体、抗TSG101抗体(Jackson Immunoresearch)使用抗兔二抗37℃震荡孵育1小时;
- [0146] f.现场配制ECL(Millipore)工作液,PVDF膜转印一侧与ECL工作液接触室温避光共孵育1min,吸水纸吸尽多余液体;
- [0147] g.化学发光检测样本中外泌体标志蛋白水平(Fujifilm)。
- [0148] 实施例2:

[0149] 一种人尿液来源的外泌体纯化的使用方法,步骤如下(具体结果结合图4-图6):

[0150] (1) 外泌体纯化用液体准备

[0151] a. 配制平衡缓冲液(PBS, pH6.0), 0.025 μ m混合纤维素酯(MCE)真空抽滤, 平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;

[0152] b. 配制洗涤缓冲液(2M NaCl, 1M NaOH, 30%异丙醇), 0.025 μ m混合纤维素酯(MCE)真空抽滤, 平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;

[0153] d. ddH₂O 0.025 μ m混合纤维素酯(MCE)真空抽滤, 平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;

[0154] e. 配制保存液20%乙醇, 0.1 μ m混合纤维素酯(MCE)真空抽滤, 平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;

[0155] (2) 人中段晨尿采集

[0156] a. 常规条件下, 使用带盖尿杯采集中段晨尿约100ml;

[0157] b. 采集后的2-3min内, 将尿液在紫外照射15分钟的超净工作台内倒入预先加入1ml 2%硫柳汞的灭菌玻璃烧杯中, 同时分别加入2片蛋白酶抑制剂和2片磷酸酶抑制剂cocotail (Roche), 至于磁力搅拌器上快速搅拌, 以充分溶解;

[0158] c. 混匀尿液样本立即用于下游外泌体分离。

[0159] (3) 人尿液样本外泌体纯化前澄清

[0160] a. 尿液样本分别装于2个50ml无菌离心管中, 4 $^{\circ}$ C下200g离心10min, 保留上清;

[0161] b. 尿液上清转移至新的2个50ml无菌离心管, 4 $^{\circ}$ C下2000g离心15min, 保留上清并转移至新的50ml无菌离心管, 绝对避免破坏沉淀;

[0162] c. 尿液上清, 4 $^{\circ}$ C下10000g离心15min, 保留约85ml上清并转移至预先灭菌的100ml烧杯中;

[0163] d. 向离心管中分别加入8ml 300mg/ml二硫苏糖醇(DTT), 37 $^{\circ}$ C孵育10min, 冰浴冷却;

[0164] f. 将尿液上清和沉淀重悬液混合, 使用0.22 μ m PES膜微孔过滤器过滤, 收集约80ml澄清尿液。

[0165] 该样本即可用于外泌体纯化。

[0166] (4) 人尿液来源外泌体纯化

[0167] a. 将分离柱A和分离柱B通过鲁尔接口上下直接串联;

[0168] b. 通过上转接头与下转接头将串联的分离柱柱连接至放置于4 $^{\circ}$ C的层析柜中的AKTA pure (FPLC);

[0169] c. 启动FPLC, 保持反压阀关闭, 使用ddH₂O以自40cm/h逐步提升至500cm/h流速反向流过层析柱, 测试并确认流路无渗漏;

[0170] d. 使用ddH₂O以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处;

[0171] e. 使用磷酸盐缓冲液, pH6.0以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定;

[0172] f. 通过A泵经A1通路以500cm/h线性流速开始上样80ml澄清尿液样本, 并收集流穿液, 流穿液即为纯化后人尿液来源外泌体, 共收集约收集约85毫升;

[0173] g. 预先使用450ml PBS, pH7.4以300cm/hr线性流速平衡连接于柱塞泵的150ml柱

体积spdex G-25medium脱盐柱;

[0174] h.吸取50毫升纯化外泌体,由柱塞泵驱动,以300cm/hr线性流速经脱盐柱脱盐,收集流出液约65ml,室温暂存;

[0175] i.使用约300ml PBS,ph7.4继续由柱塞泵驱动以300cm/hr线性流速清洗脱盐柱,弃流出液;

[0176] j.吸取剩余约35ml纯化外泌体,由柱塞泵驱动,以300cm/hr线性流速经脱盐柱脱盐,收集流出液;

[0177] k.样本上样完后,使用约340ml PBS,约65ml,,ph7.4继续由柱塞泵驱动以300cm/hr线性流速流过脱盐柱,共收集约65ml流出,其后流出液弃之;

[0178] l.合并两次脱盐外泌体样本,共计约130ml;

[0179] m.使用10KD超滤膜包(PALL)通过蠕动泵以70ml/min流速超滤浓缩外泌体样本至约8ml

[0180] n.加入15ml 10KD超滤管(Millipore),5000g 4℃离心30min外泌体浓缩至约500ul,用于外泌体鉴定;

[0181] o.收集外泌体浓缩液约1ml,分装后冻存于-204℃用于后续外泌体鉴定检测。

[0182] p.使用再生液(2M NaCl、1MNaCl、30%异丙醇)以40cm/h流速反向冲洗分离柱5分钟,静置15min,再反向40cm/h流速反向冲洗分离柱10分钟;

[0183] q.使用ddH2O以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处;

[0184] r.不再使用的分离柱,使用再生液(2M NaCl、1MNaCl、30%异丙醇)以40cm/h流速反向冲洗分离柱5分钟,静置15min,再反向40cm/h流速反向冲洗分离柱10分钟;

[0185] s.使用ddH2O以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处;

[0186] t.使用20%乙醇以100cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处;

[0187] u.自FPLC取下分离柱,并将分离柱上下口使用原堵头密封,放置于4度保存。

[0188] (5) 人尿液来源外泌体鉴定

[0189] A.透射电镜检测分离的人尿液外泌体形态

[0190] a.吸取100μl外泌体样本至1.5ml EP管中,震荡混匀器震荡EP管,逐滴加入100μl已平衡至室温的8%多聚甲醛溶液;

[0191] b.混合样本,12000rpm室温瞬时离心5s,室温静置孵育10min;

[0192] c.吸取200μl样本至0.5ml 10KD超滤管(Millipore),ddH2O补足500μl,14000g,4℃离心20min,弃去滤出液;

[0193] d.拆出超滤管中滤膜组件,反插入新的配套EP管中,2000g室温离心2min,收集浓缩外泌体,约50μl;

[0194] e.自电镜铜网盒中,使用电镜用自锁弯头镊取出200目覆碳膜电镜铜网,将碳膜一侧向上,将镊子侧转水平放置于实验台白色定性滤纸上;

[0195] f.吸取10μl浓缩外泌体样本,滴加至铜网碳膜上,室温静置1min;

[0196] g.直头尖镊夹取剪裁为小块的慢速定量滤纸,垂直夹取,自镊子加持位置吸干铜

网液体;

[0197] h.吸取10 μ l ddH₂O,轻柔滴加至铜网碳膜上后立即吸去(如步骤i);

[0198] i.吸取10 μ l 1%醋酸双氧铀染液,轻柔滴加至200目电镜铜网碳膜一侧,室温静置1min,迅速吸取染液;

[0199] j.将铜网静置于红外灯下,距离约20cm,铜网照射干燥5min;

[0200] k.重复步骤g-1两次,制作平行电镜样本2个;

[0201] l.当日使用透射电镜(FEI Tecnai G2Spirit)观察并记录分离的人尿液来源外泌体样本。

[0202] B.激光纳米追踪技检测分离的人尿液来源外泌体粒径分布

[0203] a.吸取150 μ l外泌体浓缩液至1.5ml EP管中,加入150 μ l已平衡至室温的8%多聚甲醛溶液,迅速吹打混匀;

[0204] b.装有混合样本的1.5ml EP管于12000rpm室温瞬时离心10s,室温静置孵育10min;

[0205] c.样本使用ddH₂O 2倍梯度稀释外泌体样本分别为1:10、1:20、1:40倍,上机检测(Particle Metrix),取最佳稀释度值为检测结果。

[0206] C.外泌体相关蛋白免疫印迹检测

[0207] I样本制备

[0208] a.吸取250 μ l样本至0.5ml 10KD超滤管(Millipore),ddH₂O补足至500 μ l,14000g 4℃离心25min,弃去滤出液;

[0209] b.拆出超滤管中滤膜组件,反插入新的配套EP管中,2000g 4℃离心2min,收集浓缩外泌体,约50 μ l;

[0210] c.向外泌体样本中加入13 μ l 5X loading buffer(Thermo),震荡混匀;

[0211] d.样本于带热盖金属浴中95℃加热5min,冷却至室温备用;

[0212] e.细胞刮刮取常规培养汇集度约60%HeLa细胞作为检测阳性样本,用2ml冰浴预冷PBS重悬细胞并等量转移至两个1.5ml EP管中;

[0213] f.细胞样本200g 4℃离心10min,弃尽上清;

[0214] g.向每个EP管的沉淀中分别加入300 μ l预冷RIPA(含蛋白酶抑制剂cocktail),充分吹打细胞沉淀;

[0215] h.EP管4℃混匀孵育30min,合并于1个1.5ml EP管中;

[0216] i.样本冰浴超声破碎2-3秒,以切断释放的gDNA并进一步破碎未充分破碎细胞及细胞碎片;

[0217] j.细胞样本12000rpm 4℃离心30min,保留上清约600 μ l;

[0218] k.吸取400 μ l细胞裂解液上清,加入100 μ l 5X loading buffer(Thermo),震荡混匀;

[0219] l.样本于带热盖金属浴中95℃加热5min,冷却至室温备用;

[0220] II免疫印迹检测

[0221] a.HeLa细胞裂解液为阳性样本(PC)上样15 μ l与外泌体样本上样20 μ l,15%SDS-PAGE(CD63\CD9)80V电泳30min,10%SDS-PAGE

[0222] (TSG101)80V电泳30min;120V电泳至缓冲液染料距电泳胶下缘约0.5cm;

- [0223] b. 0.22 μ m PVDF膜 (PALL) 90V湿法转膜;
- [0224] c. 5%脱脂奶粉/TBST室温摇床孵育1hr;
- [0225] d. 3%BSA/TBST稀释抗CD63抗体 (Abcam, 1:2000)、CD9 (Abcam, 1:2000)、TSG101 (Abcam, 1:2000), 4 $^{\circ}$ C震荡孵育过夜;
- [0226] e. 抗CD63抗体使用抗鼠二抗 (Jackson Immunoresearch), 抗CD9抗体、抗TSG101抗体 (Jackson Immunoresearch) 使用抗兔二抗37 $^{\circ}$ C震荡孵育1小时;
- [0227] f. 现场配制ECL (Millopore) 工作液, PVDF膜转印一侧与ECL工作液接触室温避光共孵育1min, 吸水纸吸尽多余液体;
- [0228] g. 化学发光检测样本中外泌体标志蛋白水平 (Fujifilm)。
- [0229] 实施例3:
- [0230] 一种大肠杆菌外膜囊泡纯化的使用方法, 具体如下 (具体结果结合图7-图8):
- [0231] (1) 大肠杆菌外膜囊泡纯化用液体准备
- [0232] a. 配制平衡缓冲液 (Tris-HCl, pH8), 0.025 μ m混合纤维素酯 (MCE) 真空抽滤, 平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;
- [0233] b. 配制洗涤缓冲液 (2M NaCl, 0.5M NaOH, 30%异丙醇), 0.025 μ m混合纤维素酯 (MCE) 真空抽滤, 平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;
- [0234] d. ddH₂O 0.025 μ m混合纤维素酯 (MCE) 真空抽滤, 平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;
- [0235] e. 配制保存液20%乙醇, 0.1 μ m混合纤维素酯 (MCE) 真空抽滤, 平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;
- [0236] (2) 大肠杆菌培养上清采集
- [0237] a. 高压蒸汽灭菌竹制牙签挑取少量液氮保存菌株 *Escherichia coli* TOP10 (氨苄青霉素抗性) 并置于2ml氨苄抗性LB培养基中;
- [0238] b. 菌液于37 $^{\circ}$ C摇床200rpm培养约8hr;
- [0239] c. 1:1000接种菌液至220ml氨苄抗性LB培养基中 (1L锥形瓶), 300rpm培养约15hr;
- [0240] d. 收集菌液, 冰浴备用可用于下游样本澄清。
- [0241] (3) 大肠杆菌培养上清样本外膜囊泡纯化前处理
- [0242] a. 调节菌液至pH8.0;
- [0243] b. 菌液于6000g室温离心20min, 保留上清约200ml;
- [0244] c. 菌液上清中加入4000U Benzonase (Merk) 和终浓度2mM MgCl₂, 37 $^{\circ}$ C孵育30min, 后冰浴冷却;
- [0245] d. 菌液上清使用真空泵依次经单层5 μ m、0.45 μ m、0.22 μ m PES滤膜抽滤过滤;
- [0246] 该样本即可用于大肠杆菌外膜囊泡纯化。
- [0247] (4) 大肠杆菌培养上清来源外膜囊泡纯化与浓缩
- [0248] a. 将分离柱A和分离柱B通过鲁尔接口上下直接串联;
- [0249] b. 通过上转接头与下转接头将串联的分离柱柱连接至放置于4 $^{\circ}$ C的层析柜中的 AKTA pure (FPLC);
- [0250] c. 启动FPLC, 保持反压阀关闭, 使用ddH₂O以自40cm/h逐步提升至500cm/h流速反向流过层析柱, 测试并确认流路无渗漏;
- [0251] d. 使用ddH₂O以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至

基线处；

[0252] e.使用磷酸盐缓冲液,pH8.0以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定；

[0253] f.通过A泵经A1通路以500cm/h线性流速开始上样200ml澄清大肠杆菌培养上清样本,并收集流穿液,流穿液即为纯化后大肠杆菌培养上清来源外膜囊泡,共收集约200ml；

[0254] g.使用10KD超滤膜包(PALL)通过蠕动泵以70ml/min流速超滤浓缩外泌体样本至约12ml

[0255] h.加入15ml 10KD超滤管(Millipore),5000g 4℃离心30min外泌体浓缩至约0.5ml,用于外泌体鉴定；

[0256] o.收集外泌体浓缩液0.5ml,分装后冻存于-20℃用于后续外泌体鉴定检测。

[0257] p.使用再生液(2M NaCl、1MNaCl、30%异丙醇)以40cm/h流速反向冲洗分离柱5分钟,静置15min,再反向40cm/h流速反向冲洗分离柱10分钟；

[0258] q.使用ddH2O以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处；

[0259] r.不再使用的分离柱,使用再生液(2M NaCl、1MNaCl、30%异丙醇)以40cm/h流速反向冲洗分离柱5分钟,静置15min,再反向40cm/h流速反向冲洗分离柱10分钟；

[0260] s.使用ddH2O以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处；

[0261] t.使用20%乙醇以100cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处；

[0262] u.自FPLC取下分离柱,并将分离柱上下口使用原堵头密封,放置于4度保存。

[0263] (5) 大肠杆菌培养上清来源外膜囊泡鉴定

[0264] A.透射电镜检测分离的大肠杆菌培养上清外膜囊泡形态

[0265] a.吸取100μl外膜囊泡样本至1.5ml EP管中,震荡混匀器震荡EP管,逐滴加入110μl已平衡至室温的8%多聚甲醛溶液；

[0266] b.混合样本,12000rpm室温瞬时离心5s,室温静置孵育10min；

[0267] c.吸取200μl样本至0.5ml 10KD超滤管(Millipore),ddH2O补足500μl,14000g,4℃离心20min,弃去滤出液；

[0268] d.拆出超滤管中滤膜组件,反插入新的配套EP管中,2000g室温离心2min,收集浓缩外膜囊泡,约65μl；

[0269] e.自电镜铜网盒中,使用电镜用自锁弯头镊取出200目覆碳膜电镜铜网,将碳膜一侧向上,将镊子侧转水平放置于实验台白色定性滤纸上；

[0270] f.吸取10μl浓缩外膜囊泡样本,滴加至铜网碳膜上,室温静置1min；

[0271] g.直头尖镊夹取剪裁为小块的慢速定量滤纸,垂直夹取,自镊子加持位置吸干铜网液体；

[0272] h.吸取10μl ddH2O,轻柔滴加至铜网碳膜上后立即吸去(如步骤i)；

[0273] i.吸取10μl 1%醋酸双氧铀染液,轻柔滴加至200目电镜铜网碳膜一侧,室温静置1min,迅速吸取染液；

[0274] j.将铜网静置于红外灯下,距离约20cm,铜网照射干燥5min；

- [0275] k.重复步骤g-1两次,制作平行电镜样本2个;
- [0276] l.当日使用透射电镜(FEI Tecnai G2Spirit)观察并记录分离的大肠杆菌培养上清来源外膜囊泡样本。
- [0277] B.激光纳米追踪技检测分离的大肠杆菌培养上清来源外膜囊泡粒径分布
- [0278] a.吸取350 μ l外膜囊泡浓缩液至1.5ml EP管中,震荡EP管,逐滴加入350 μ l已平衡至室温的8%多聚甲醛溶液;
- [0279] b.装有混合样本的1.5ml EP管于12000rpm室温瞬时离心10s,室温静置孵育10min;
- [0280] c.样本使用ddH₂O 2倍梯度稀释外膜囊泡样本分别为1:5、1:10、1:20、1:40倍,上机检测(Particle Metrix),取最佳稀释度值为检测结果。
- [0281] 实施例4:
- [0282] 一种293T细胞外泌体纯化的使用方法,步骤如下(具体结果结合图9-图11):
- [0283] (1) 293T细胞外泌体纯化用液体准备
- [0284] a.配制平衡缓冲液(Tris-HCl, pH8), 0.025 μ m混合纤维素酯(MCE)真空抽滤,平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;
- [0285] b.配制洗涤缓冲液(2M NaCl, 1M NaOH, 30%异丙醇), 0.025 μ m混合纤维素酯(MCE)真空抽滤,平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;
- [0286] d.ddH₂O 0.025 μ m混合纤维素酯(MCE)真空抽滤,平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;
- [0287] e.配制保存液20%乙醇, 0.1 μ m混合纤维素酯(MCE)真空抽滤,平衡至22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C备用;
- [0288] (2) 293T细胞培养上清采集
- [0289] I外泌体去除FBS浓度筛选
- [0290] a.DMEM培养基分别加入FBS(GIBCO)和外泌体去除FBS(GIBCO)至终浓度为10%、5%、2.5%、1.25%和0.63%,备用;
- [0291] b.接种2000每孔293T细胞至96孔板,共计60平行孔(培养板最外圈孔只加入0.1ml 无菌PBS);
- [0292] c.细胞接种后24小时,更换为a中所准备的不同浓度血清培养基,每组6个平行孔;
- [0293] d.细胞更换培养基后24hr和48hr分别使用CellTiter-Glo(Promega)检测细胞活力,比较各浓度水平与培养时长FBS和去外泌体FBS培养细胞活力与常规培养条件下细胞活力的差异;
- [0294] e.根据细胞活力结果选择48小时培养时长,最低无毒性去外泌体FBS浓度2.5%作为外泌体制备培养基去外泌体FBS条件。
- [0295] II细胞培养上清采集
- [0296] a.复苏冻存293T细胞(200万/支),台盼蓝染色,细胞计数板计数,显示细胞存活率90%;
- [0297] b.接种293T细胞于10cm培养皿中,加入10ml DEME培养基,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂常规培养;
- [0298] c.每2-3天,当细胞汇集度达80%时细胞1:4-6传代,每皿10ml培养基;
- [0299] d.准备共计12皿10cm细胞培养皿,293T细胞汇集度约30%,PBS轻柔漂洗细胞2次,每皿更换为10ml 2.5%去外泌体FBS-DMEM,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂常规培养;

- [0300] e. 细胞培养48小时后,收集全部约110ml 293T细胞培养上清,备用。
- [0301] (3) 293T细胞培养上清样本外泌体纯化前澄清
- [0302] a. 293T细胞培养上清于室温200g离心10min,保留上清约105ml;
- [0303] b. 细胞培养上清于室温2000g离心15min,保留上清约100ml;
- [0304] c. 细胞培养上清中加入2000U Benzonase (Merk) 和终浓度2mM的MgCl₂, 37℃孵育20min冰浴冷却;
- [0305] d. 细胞培养上清使用真空泵抽滤过滤,滤膜直径为50mm圆形,孔径为5μm、0.45μm、0.22μm PES滤膜自上而下依次单层重叠固定于可拆卸式滤器中;
- [0306] e. 调节样本pH值至pH8.0共收集约100ml细胞培养上清样本。
- [0307] 样本即可用于外泌体纯化。
- [0308] (4) 293T细胞培养上清来源外泌体纯化
- [0309] a. 将分离柱A和分离柱B通过鲁尔接口上下直接串联;
- [0310] b. 通过上转接头与下转接头将串联的分离柱柱连接至放置于4℃的层析柜中的AKTA pure (FPLC);
- [0311] c. 启动FPLC,保持反压阀关闭,使用ddH₂O以自40cm/h逐步提升至500cm/h流速反向流过层析柱,测试并确认流路无渗漏;
- [0312] d. 使用ddH₂O以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处;
- [0313] e. 使用TrisHCl缓冲液,pH8.0以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定;
- [0314] f. 通过A泵经A1通路以350cm/h线性流速开始上样100ml澄清细胞培养上清样本,并收集流穿液,流穿液即为纯化后293T细胞培养上清来源外泌体,共收集约95毫升;
- [0315] g. 预先使用450ml PBS,pH7.4以300cm/hr线性流速平衡连接于柱塞泵的150ml柱体积sphedex G-25medium脱盐柱;
- [0316] h. 吸取50毫升纯化外泌体,由柱塞泵驱动,以300cm/hr线性流速经脱盐柱脱盐,收集流出液约65ml,室温暂存;
- [0317] i. 使用约300ml PBS,ph7.4继续由柱塞泵驱动以300cm/hr线性流速清洗脱盐柱,弃流出液;
- [0318] j. 吸取剩余约45ml纯化外泌体,PBS补足50ml,由柱塞泵驱动,以300cm/hr线性流速经脱盐柱脱盐,收集流出液;
- [0319] k. 合并两次脱盐外泌体样本,共计约130ml;
- [0320] l. 使用10KD超滤膜包 (PALL) 通过蠕动泵以70ml/min流速超滤浓缩外泌体样本至约10ml;
- [0321] m. 加入15ml 10KD超滤管 (Millipore),PBS补足12ml,5000g 4℃离心30min,外泌体浓缩至约500ul,用于外泌体鉴定;
- [0322] n. 收集外泌体浓缩液约0.5ml,分装后冻存于-204℃用于后续外泌体鉴定检测。
- [0323] o. 使用再生液 (2M NaCl、1MNaOH、30%异丙醇) 以40cm/h流速反向冲洗分离柱5分钟,静置15min,再反向40cm/h流速反向冲洗分离柱10分钟;
- [0324] p. 使用ddH₂O以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至

基线处；

[0325] q. 不再使用的分离柱,使用再生液(2M NaCl、1MNaOH、30%异丙醇)以40cm/h流速反向冲洗分离柱5分钟,静置15min,再反向40cm/h流速反向冲洗分离柱10分钟；

[0326] r. 使用ddH₂O以500cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处；

[0327] s. 使用20%乙醇以100cm/h线性流速正向冲洗分离柱直至UV曲线和电导曲线稳定至基线处；

[0328] t. 自FPLC取下分离柱,并将分离柱上下口使用原堵头密封,放置于4度保存。

[0329] (5) 293T细胞培养上清来源外泌体鉴定

[0330] A. 透射电镜检测分离的293T细胞培养上清外泌体形态

[0331] a. 吸取100μl外泌体样本至1.5ml EP管中,震荡混匀器震荡EP管,逐滴加入200μl已平衡至室温的8%多聚甲醛溶液；

[0332] b. 混合样本,12000rpm室温瞬时离心5s,室温静置孵育10min；

[0333] c. 吸取300μl样本至0.5ml 10KD超滤管(Millipore),ddH₂O补足500μl,14000g,4℃离心25min,弃去滤出液；

[0334] d. 拆出超滤管中滤膜组件,反插入新的配套EP管中,2000g室温离心2min,收集浓缩外泌体,约50μl；

[0335] e. 自电镜铜网盒中,使用电镜用自锁弯头镊取出200目覆碳膜电镜铜网,将碳膜一侧向上,将镊子侧转水平放置于实验台白色定性滤纸上；

[0336] f. 吸取10μl浓缩外泌体样本,滴加至铜网碳膜上,室温静置1min；

[0337] g. 直头尖镊夹取剪裁为小块的慢速定量滤纸,垂直夹取,自镊子加持位置吸干铜网液体；

[0338] h. 吸取10μl 1%醋酸双氧铀染液,轻柔滴加至200目电镜铜网碳膜一侧,室温静置1min,迅速吸取染液；

[0339] i. 铜网原位放置于铜网盒中,等待检测；

[0340] j. 重复步骤e-i两次,制作平行电镜样本2个；

[0341] k. 当日使用透射电镜(FEI Tecnai G2Spirit)观察并记录分离的293T细胞培养上清来源外泌体样本。

[0342] B. 激光纳米追踪技检测分离的293T细胞培养上清来源外泌体粒径分布

[0343] a. 吸取100μl外泌体浓缩液至1.5ml EP管中,加入100μl已平衡至室温的8%多聚甲醛溶液,迅速吹打混匀；

[0344] b. 装有混合样本的1.5ml EP管于12000rpm室温瞬时离心10s,室温静置孵育10min；

[0345] c. 样本使用ddH₂O 2倍梯度稀释外泌体样本分别为1:10、1:20、1:40倍,上机检测(Particle Metrix),取最佳稀释度值为检测结果。

[0346] C. 外泌体相关蛋白免疫印迹检测

[0347] I样本制备

[0348] a. 吸取300μl样本至0.5ml 10KD超滤管(Millipore),ddH₂O补足至500μl,14000g 4℃离心15min,弃去滤出液；

- [0349] b. 拆出超滤管中滤膜组件,反插入新的配套EP管中,2000g 4℃离心2min,收集浓缩外泌体,约100μl;
- [0350] c. 向外泌体样本中加入25μl 5X loading buffer (Thermo),震荡混匀;
- [0351] d. 样本于带热盖金属浴中95℃加热5min,冷却至室温备用;
- [0352] e. 细胞刮刮取常规培养汇集度约60%HeLa细胞作为检测阳性样本,用2ml冰浴预冷PBS重悬细胞并等量转移至两个1.5ml EP管中;
- [0353] f. 细胞样本200g 4℃离心10min,弃尽上清;
- [0354] g. 向每个EP管的沉淀中分别加入300μl预冷RIPA(含蛋白酶抑制剂cocktail),充分吹打细胞沉淀;
- [0355] h. EP管4℃混匀孵育30min,合并于1个1.5ml EP管中;
- [0356] i. 样本冰浴超声破碎2-3秒,以切断释放的gDNA并进一步破碎未充分破碎细胞及细胞碎片;
- [0357] j. 细胞样本12000rpm 4℃离心30min,保留上清约600μl;
- [0358] k. 吸取400μl细胞裂解液上清,加入100μl 5X loading buffer (Thermo),震荡混匀;
- [0359] l. 样本于带热盖金属浴中95℃加热5min,冷却至室温备用;
- [0360] II免疫印迹检测
- [0361] a. HeLa细胞裂解液为阳性样本(PC)上样15μl与外泌体样本上样20μl,15%SDS-PAGE (CD63\CD9) 80V电泳30min,10%SDS-PAGE (TSG101) 80V电泳30min;120V电泳至缓冲液染料距电泳胶下缘约0.5cm;
- [0362] b. 0.1μm PVDF膜(PALL) 90V湿法转膜;
- [0363] c. 5%脱脂奶粉/TBST室温摇床孵育1hr;
- [0364] d. 3%BSA/TBST稀释抗CD63抗体(Abcam,1:2000)、CD9(Abcam,1:2000)、ANNEXIN(Abcam,1:3000),Syntenin(Abcam,1:4000)、GM130(Abcam,1:2500)、Alix(1:5000) 4℃摇床孵育过夜;
- [0365] e. 抗CD63抗体和抗Alix抗体使用抗鼠二抗(Jackson Immuno-research),抗CD9抗体、抗ANNEXIN抗体、抗Syntenin抗体、使用抗兔二抗(Jackson Immunoresearch)室温摇床震荡孵育2小时;
- [0366] f. 新鲜配制ECL(Milipore)工作液,PVDF膜转印一侧与ECL工作液接触室温避光共孵育1-5min,吸水纸吸尽多余液体;
- [0367] g. 化学发光检测样本中外泌体标志蛋白水平(Fujifilm)。
- [0368] 本发明的外泌体产物纯度参数,具体见下表:

[0369]

样本	小鼠血浆	人尿液	293T培养上清	E.Coli培养基
蛋白去除率	95.4%	98.6%	97.7%	98.1%

[0370] 上述仅为本发明的较佳实施例及所运用技术原理。本领域技术人员会理解,本发明不限于这里所述的特定实施例,对本领域技术人员来说能够进行各种明显的变化、重新调整和替代而不会脱离本发明的保护范围。因此,虽然通过以上实施例对本发明进行了较为详细的说明,但是本发明不仅仅限于以上实施例,在不脱离本发明构思的情况下,还可以

包括更多其他等效实施例,而本发明的范围由所附的权利要求范围决定。

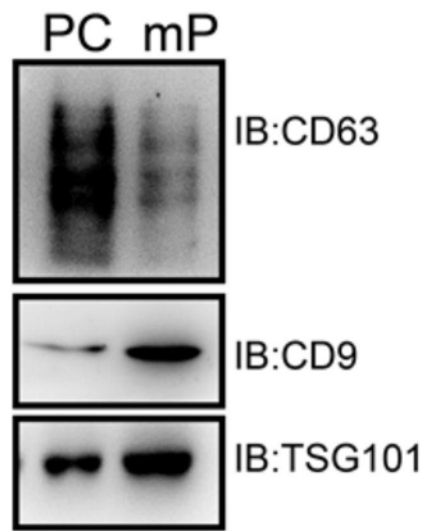


图1

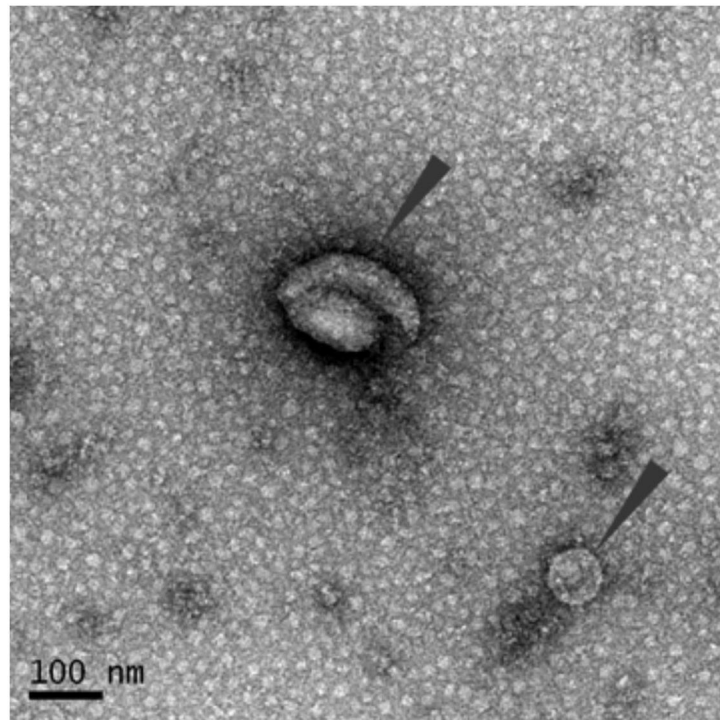


图2

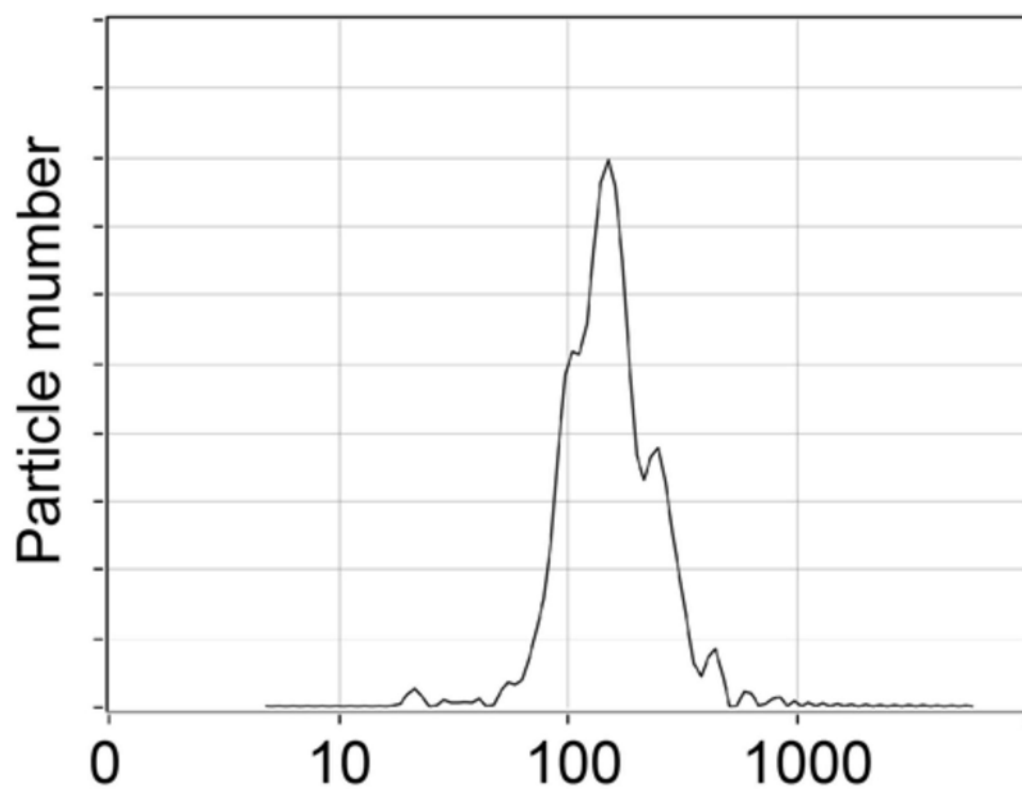


图3

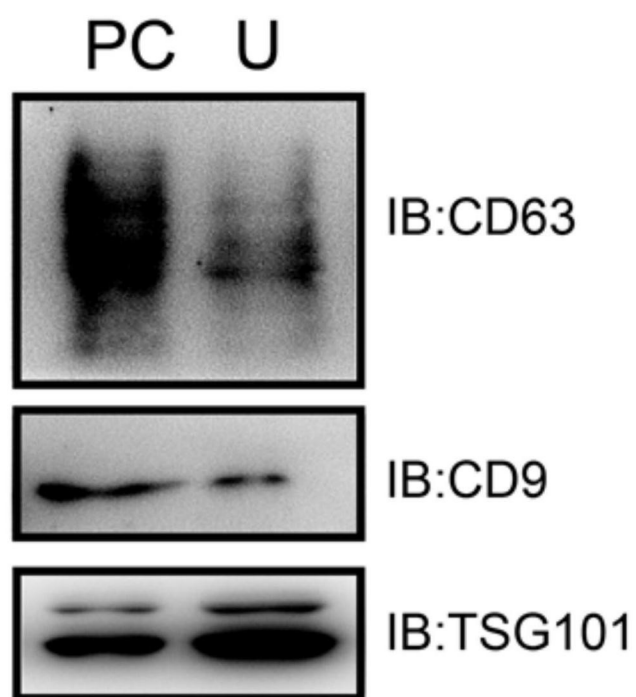


图4

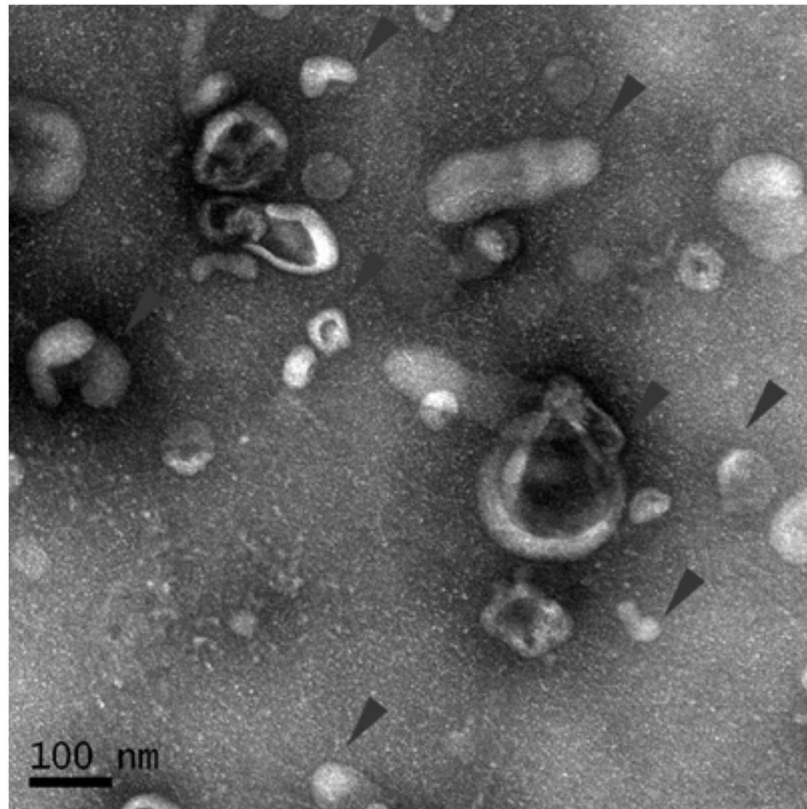


图5

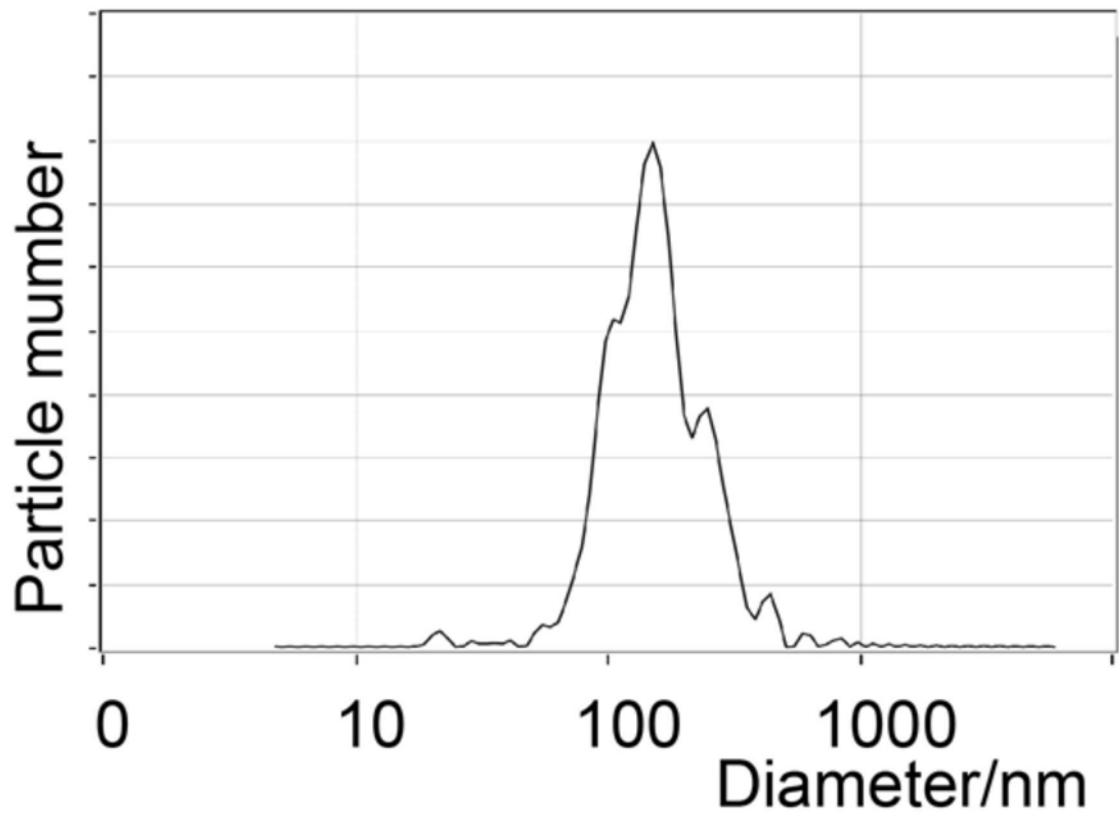


图6

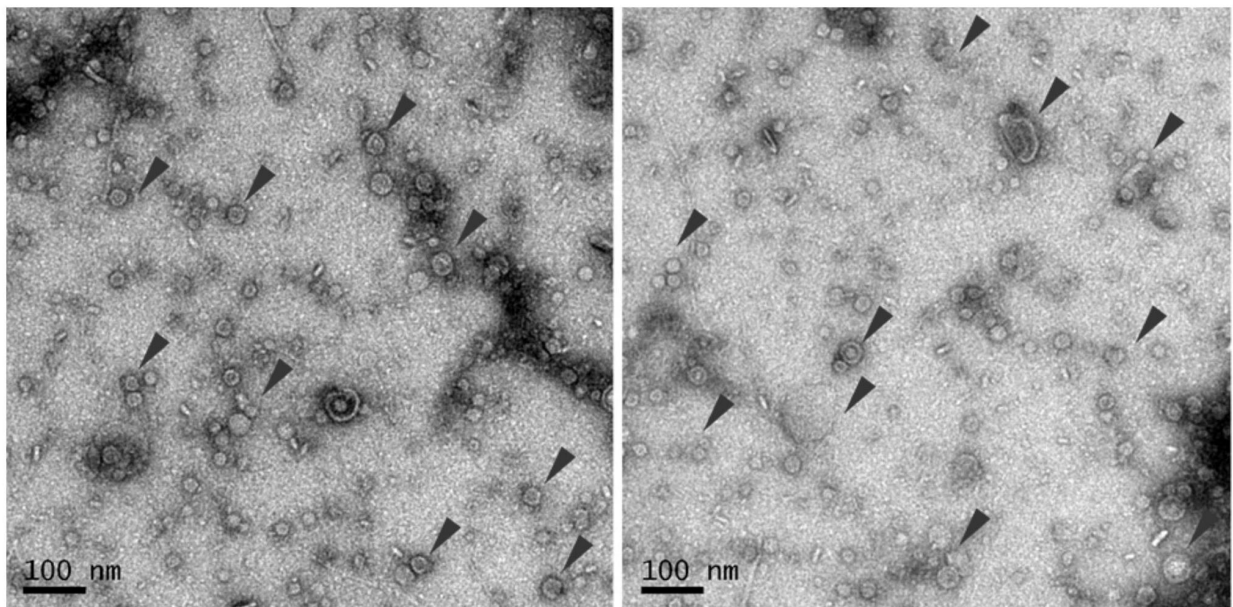


图7

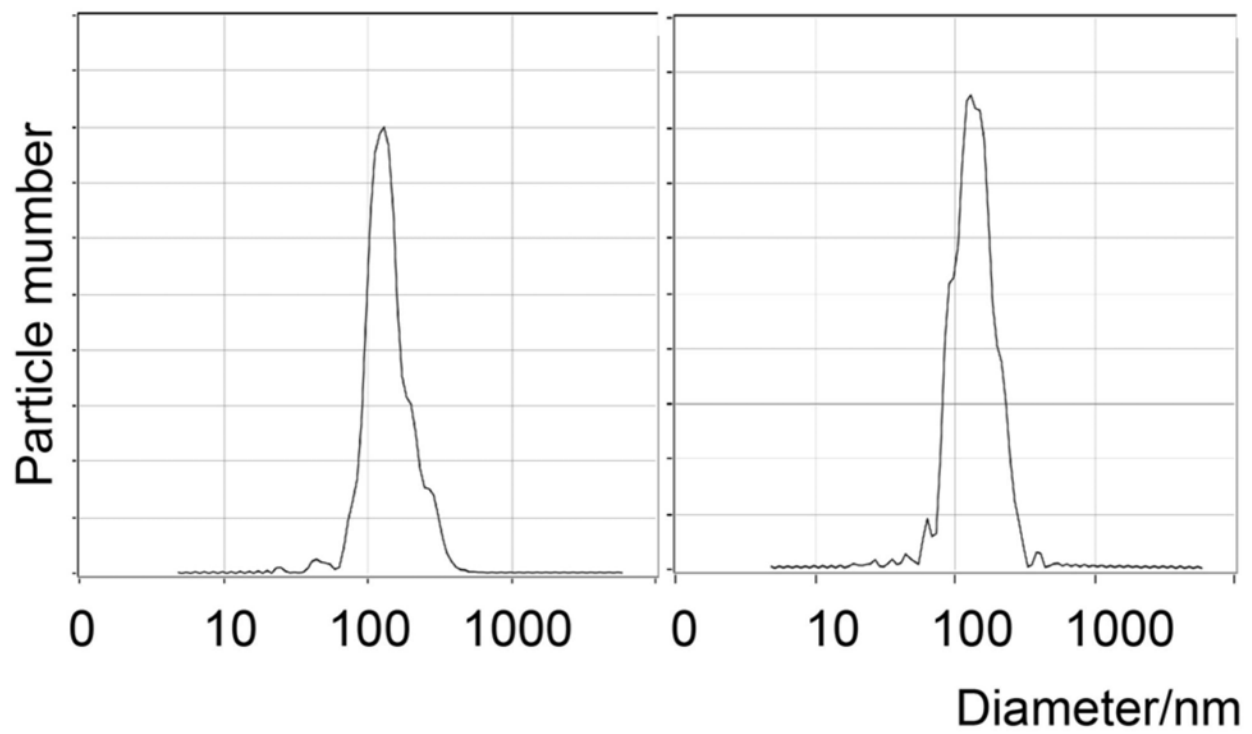


图8

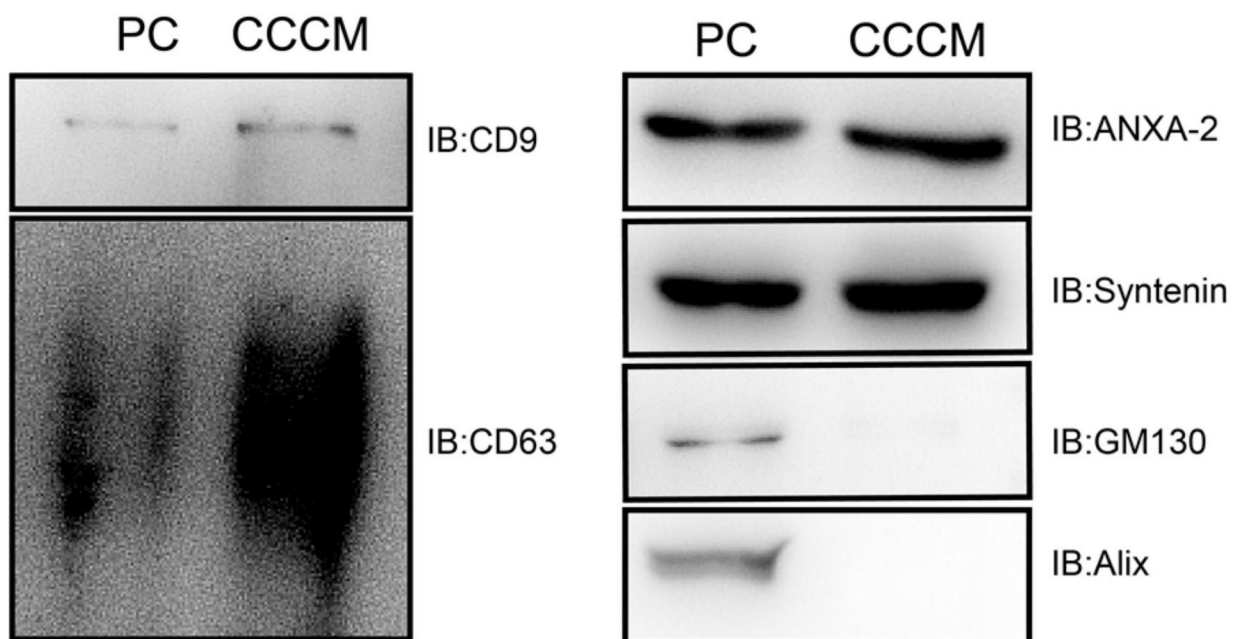


图9

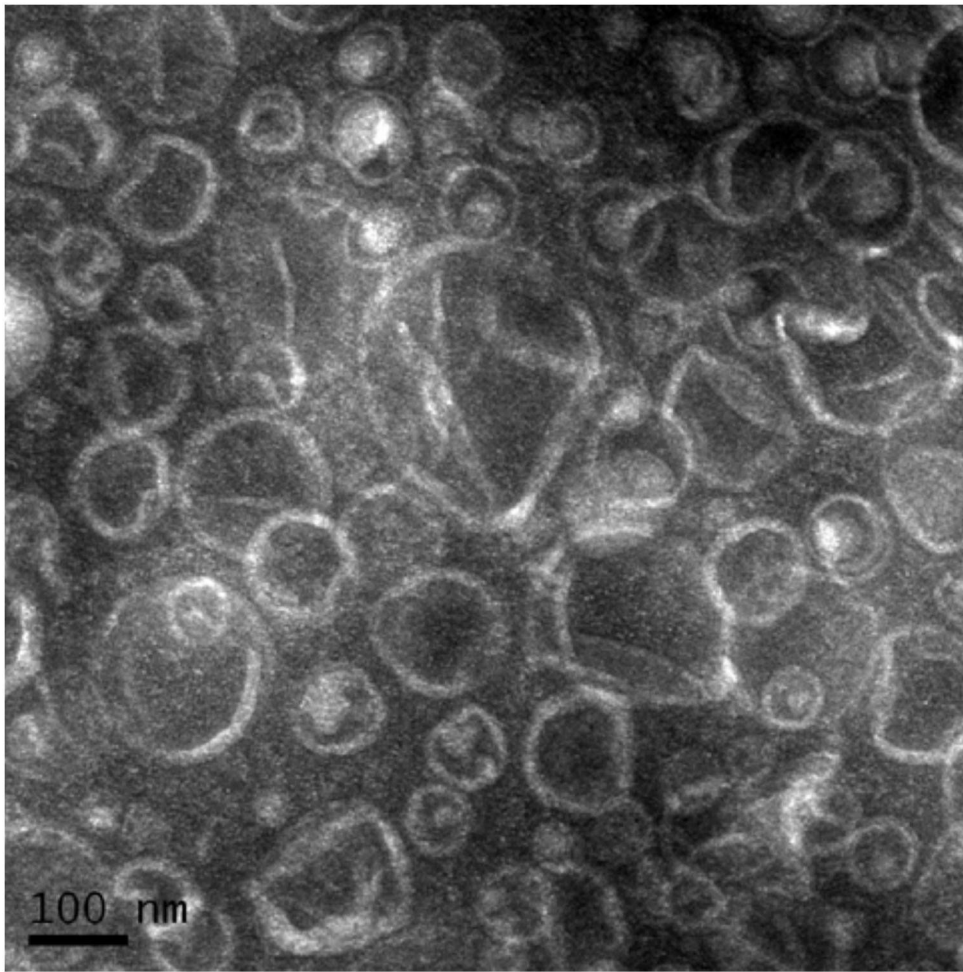


图10

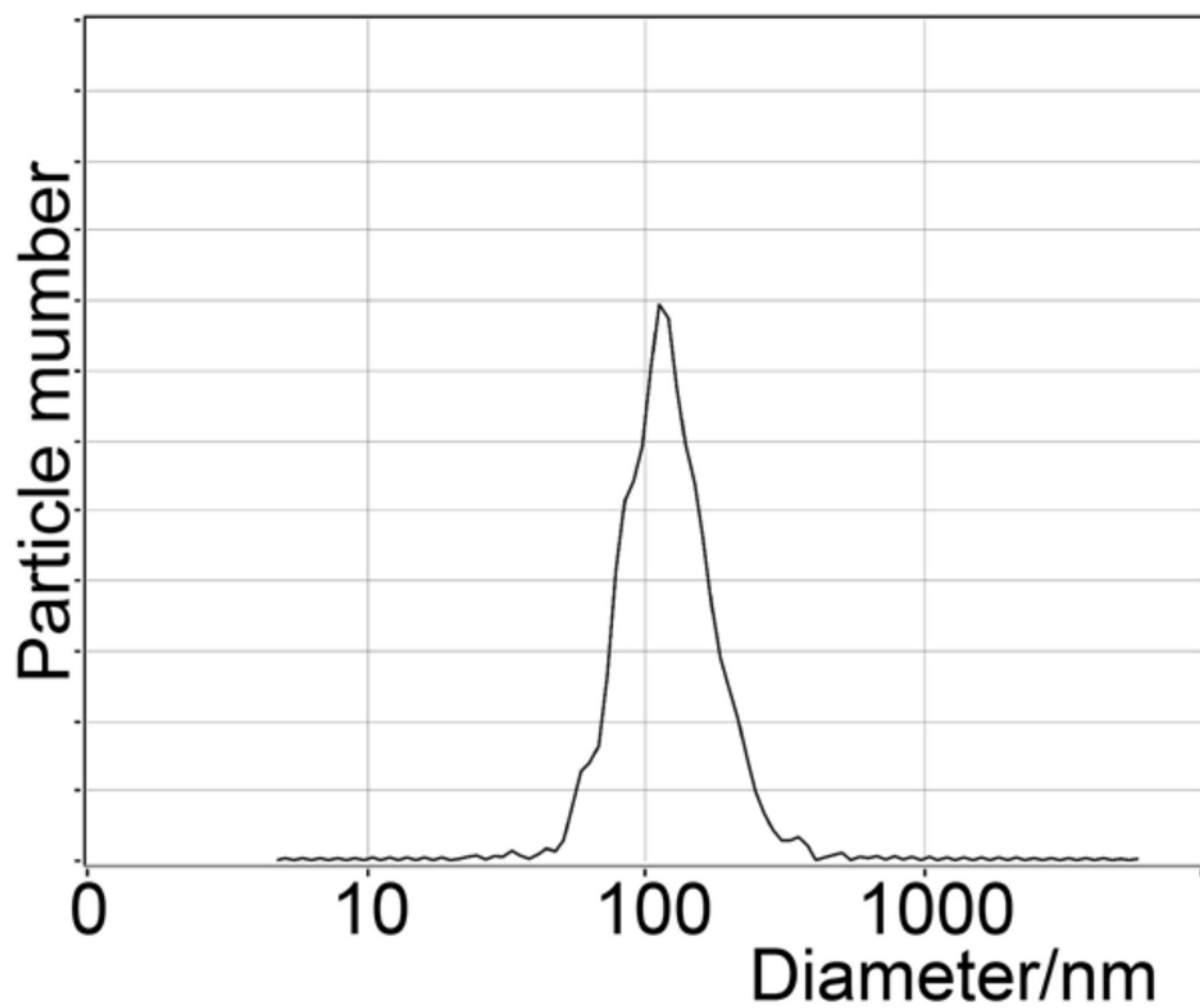


图11

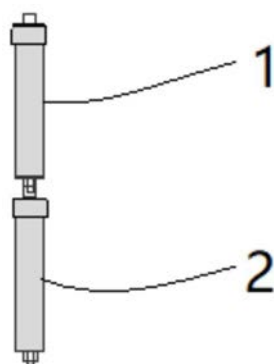


图12