



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118685347 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 24

(21) 申请号 202410838758.6

(22) 申请日 2024.06.26

(71) 申请人 珈泌生物科技(武汉)有限责任公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开
发区高新大道888号高农生物园总部B
区1栋409室

(72) 发明人 李立 吴笛笛 刘丕菊 甘宁
高小艳 滕兆伟 赵睿明 张静

(74) 专利代理机构 武汉智嘉联合知识产权代理
事务所(普通合伙) 42231
专利代理师 张杰

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010.01)

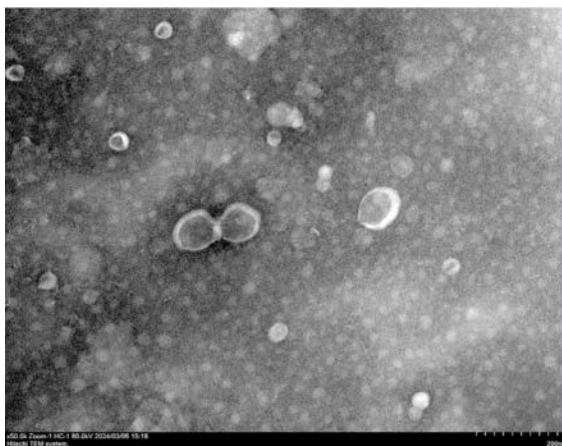
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

一种提取分离高纯度外泌体的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种提取分离高纯度外泌体的方法,包括以下步骤:取样品依次经过离心、过滤以得到无大颗粒杂质的上清;用离子交换层析填料吸附上清中的外泌体,再用洗脱液进行洗脱;将所得外泌体溶液加入自装MixQ700S填料的离心柱中,离心所得滤过液即为高纯度外泌体溶液。本发明创新地引入了自填装MixQ700S填料的离心柱,仅通过简单的离心操作即可达到完除杂质的效果,且所得外泌体完整性好。本发明方法简单易操作,并能够获取纯度高的外泌体,对外泌体的下游应用具有重要意义。



1. 一种提取分离高纯度外泌体的方法,其特征在于,包括以下步骤:
S1、取样品依次经过离心、过滤以得到无大颗粒杂质的上清;
S2、用离子交换层析填料吸附上清中的外泌体,再用洗脱液进行洗脱;
S3、将所得外泌体溶液加入装填MixQ700S填料的离心柱中,离心所得滤过液即为高纯度外泌体溶液。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤S1样品包括细胞培养液、尿液。
3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤S1所述离心为:1500-3000g离心10-20min。
4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤S1过滤采用0.22 μ m孔径滤膜。
5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤S2具体为:将离子交换层析填料、细胞上清于结合缓冲液中孵育后,离心并将沉淀转移至纯化柱中,用洗涤液进行洗涤,再用洗脱液进行洗脱。
6. 根据权利要求1或5所述的方法,其特征在于,步骤S2所述离子交换层析填料为弱阴离子交换层析填料,其中弱阴离子交换剂包括二乙胺基乙基。
7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述结合缓冲液为pH 7.0-8.0,200-500mM Tris-HCl。
8. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述洗涤液为pH 7.2-8.0,50-200mM Tris、10-150mM NaCl。
9. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述洗脱液为pH 7.2-7.5,50-100mM HEPES、100-500mM NaCl。
10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤S3所述离心为:300-1000g离心30-90s。

一种提取分离高纯度外泌体的方法

技术领域

[0001] 本发明属于外泌体分离提取技术领域,具体涉及一种提取分离高纯度外泌体的方法。

背景技术

[0002] 外泌体是由细胞分泌的具有膜结构的囊泡,直径在40~160nm之间,内含多种核酸、蛋白质、脂质等成分,在细胞间的通讯发挥重要作用。外泌体具有良好的耐受性和生物相容性、较低免疫原性、可以穿越天然屏障、可进行工程化改造等诸多优势,目前已作为递送载体被广泛应用在心血管疾病、肾损伤、免疫疾病、神经系统疾病和癌症等多种疾病的治疗研究中。

[0003] 外泌体的分离提取方法包括超速离心、超滤和尺寸排阻色谱法、聚合物沉淀、免疫亲和层析等。目前,超速离心是外泌体分离的“金标准”,但这个方法通常需要超过100000g的离心力,而且分离操作复杂且周期长。超滤和尺寸排阻色谱法都是根据外泌体尺寸进行分离的方法。超滤是将样品通过具有不同孔径的膜过滤器,根据颗粒的大小和分子量进行分离。尺寸排阻色谱也是根据颗粒的大小进行分离的,较大的颗粒先离开色谱柱被分离出来,而较小的颗粒较晚离开因此被收集。聚合物沉淀是通过添加聚乙二醇,将外泌体在溶液中形成沉淀,再通过1500g低速离心,使外泌体得以分离,该方法适用于大量样本,但所得外泌体纯度较低。免疫亲和层析是根据外泌体表面特有的抗原分子,使其与抗体相结合而被分离出来,该方法特异性强但产量较低,且难以从样品中完全除去抗体。

[0004] 近来,有研究表明,利用电荷原理通过离子交换层析填料可以提取外泌体,此方法可使用简单的离心机设备进行外泌体提取,然而,发明人在研究时发现,通过离子交换层析填料虽然可以提取到细胞上清、尿液中的外泌体,但是电镜结果显示所得外泌体背景中存在大量杂质,这对外泌体的实际使用显然是不利的。

发明内容

[0005] 针对通过离子交换填料提取的外泌体中存在大量杂质的问题,本发明提供了一种提取纯化外泌体的方法,该方法简单且有效。

[0006] 本发明的技术方案具体如下所示:

一种提取分离高纯度外泌体的方法,包括以下步骤:

S1、取样品依次经过离心、过滤以得到无大颗粒杂质的上清;

S2、用离子交换层析填料吸附上清中的外泌体,再用洗脱液进行洗脱;

S3、将所得外泌体溶液加入装填MixQ700S填料的离心柱中,离心所得滤过液即为高纯度外泌体溶液。

[0007] 在本发明方法中,步骤S1中的样品具体为细胞培养液、尿液等生物体液。发明人对经过离子交换层析填料提取的外泌体进行鉴定分析后,发现电镜显示外泌体背景中的杂质多呈现为晶体小颗粒,进一步分析发现其包含盐粒子及其他非外泌体蛋白;发明人通过大

量试验探索,发现仅利用装填MixQ700S填料的离心柱通过简单低速离心即可去除有效外泌体中的杂质,且鉴定所得电镜图背景干净。MixQ700S为一种复合模式填料,其中填料粒径为70 μ m,核壳结构微球,壳层为中性亲水层,可阻止700KD以上的蛋白进入内部,核层为阴离子交换和疏水作用功能层,常用来分离纯化蛋白。

[0008] 优选地,在上述方法中,步骤S1中的离心条件为1500-3000g离心10-20min,过滤则是采用0.22 μ m孔径滤膜对离心上清液进行过滤。本发明方法先通过离心去除样品中的大颗粒杂质,再通过过滤除去非外泌体大囊泡和大部分杂蛋白;样品经过这些前处理,就可以得到无大颗粒杂质的上清,利于后续吸附、洗脱。

[0009] 优选地,在上述方法中,步骤S2具体为:将离子交换层析填料、上清于结合缓冲液中孵育后,离心并将沉淀转移至纯化柱中,用洗涤液进行洗涤,再用洗脱液进行洗脱。

[0010] 优选地,在上述方法中,步骤S2中离子交换层析填料为弱阴离子交换层析填料,其中弱阴离子交换剂包括二乙胺基乙基。

[0011] 更优选地,在上述方法的步骤S2中,结合缓冲液为200-500mM Tris-HCl缓冲液(pH 7.0-8.0),洗涤液为50-200mM Tris、10-150mM NaCl(pH 7.2-8.0),洗脱液为50-100mM HEPES、100-500mM NaCl。

[0012] 优选地,在上述方法中,步骤S3的离心条件为:300-1000g离心30-90s。

[0013] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

针对利用离子交换层析填料吸附作用,提取分离外泌体过程中的杂质问题,本发明创新地引入了自填装MixQ700S填料的离心柱,且通过简单的离心操作即可达到完全去除杂质的效果。

附图说明

[0014] 图1为实施例1提取分离的外泌体的TEM电镜图。

[0015] 图2为对比例1提取分离的外泌体的TEM电镜图。

具体实施方式

[0016] 下面将结合实施例和附图对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述。应当理解的是,此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明,并不用于限制本发明。

[0017] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本发明的说明书和权利要求书中的术语“包括”以及它的任何变形,意图在于覆盖不排他的包含。

[0018] 以下实施例中未注明具体技术或条件的,均按照本领域内的文献所描述的技术或条件或按照产品说明书进行;所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0019] 实施例1

本例以HEK293T细胞培养液为例,按照本发明方法进行外泌体的提取和鉴定,具体包括以下步骤:

(1)取10ml细胞培养液在4 $^{\circ}$ C、1500g离心10min,去除悬浮细胞和细胞碎片,所得上清液过0.22 μ m孔径滤膜,去除较大的微囊泡,吸取5ml滤液于10ml离心管中。

[0020] (2) 移液器吸取500 μ l结合缓冲液(200mM Tris-HCl缓冲液,pH 8.0)加入到步骤(1)中装有滤液的离心管中,盖紧盖子,颠倒混匀。

[0021] (3) 吸取300 μ l DEAE树脂溶液加入到步骤(2)所得离心管中,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500 μ l上清液(不要弃掉),小心倒掉剩余上清液,用移液器中的液体(500 μ l)轻轻吹起树脂,全部转移至纯化柱中(已放入收集管),静置2min,2000g室温离心2min,吸取500 μ l的洗涤液(pH 8.0, 50mM Tris, 10mM NaCl)加入到纯化柱中,静置5min,2000g室温离心2min,将滤液及收集管一并弃掉。

[0022] (4) 将纯化柱转移至低吸附蛋白的1.5ml离心管中,加入200 μ l的洗脱液(pH 7.2, 50mM HEPES, 100mM NaCl),孵育5min,350g室温离心2min,将离心后的滤过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。

[0023] (5) 将浓缩后的外泌体溶液加入预装MixQ700S填料的离心小柱中,300g离心90s,滤过液即为去除杂质的外泌体溶液。

[0024] 对步骤(5)所得外泌体溶液进行电镜检测,结果如图1所示:电镜照片背景干净,不存在明显杂质,且外泌体较多、形态完整。

[0025] 对比例1

本例所用样品同实施例1一致,并通过以下步骤提取其外泌体:

(1) 取10ml细胞培养液在4 $^{\circ}$ C、1500g离心10min,去除悬浮细胞和细胞碎片,所得上清液过0.22 μ m孔径滤膜,去除较大的微囊泡,吸取5ml滤液于10ml离心管中。

[0026] (2) 移液器吸取500 μ l结合缓冲液(200mM Tris-HCl缓冲液,pH8.0)加入到步骤(1)中装有滤液的离心管中,盖紧盖子,颠倒混匀。

[0027] (3) 吸取300 μ l DEAE树脂加入到步骤(2)所得离心管中,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500 μ l上清液(不要弃掉),小心倒掉剩余上清液,用移液器中的液体(500 μ l)轻轻吹起树脂,全部转移至纯化柱中(已放入收集管),静置2min,2000g室温离心2min,吸取500 μ l的洗涤液(pH8.0, 50mM Tris, 10mM NaCl)加入到纯化柱中,静置5min,2000g室温离心2min,将滤液及收集管一并弃掉。

[0028] (4) 将纯化柱转移至低吸附蛋白的1.5ml离心管中,加入200 μ l的洗脱液(pH7.2, 50mM HEPES, 100mM NaCl),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外泌体溶液。

[0029] 对步骤(4)所得外泌体溶液进行电镜检测,结果如图2所示:本例所得外泌体的电镜照片背景不干净,呈现很多成片晶体小颗粒。

[0030] 综上所述,本发明通过引入自填装MixQ700S填料的离心柱,能够克服现有方法的缺陷,获取高纯度外泌体的同时,保证了外泌体的完整性好,可见本发明方法能够获取质量高的外泌体,对外泌体的下游应用具有重要意义。

[0031] 需要说明的是,以上实施例仅是本发明一部分实施例而不是全部的实施例,仅用以说明本发明的技术方案而非限制;基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动条件下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

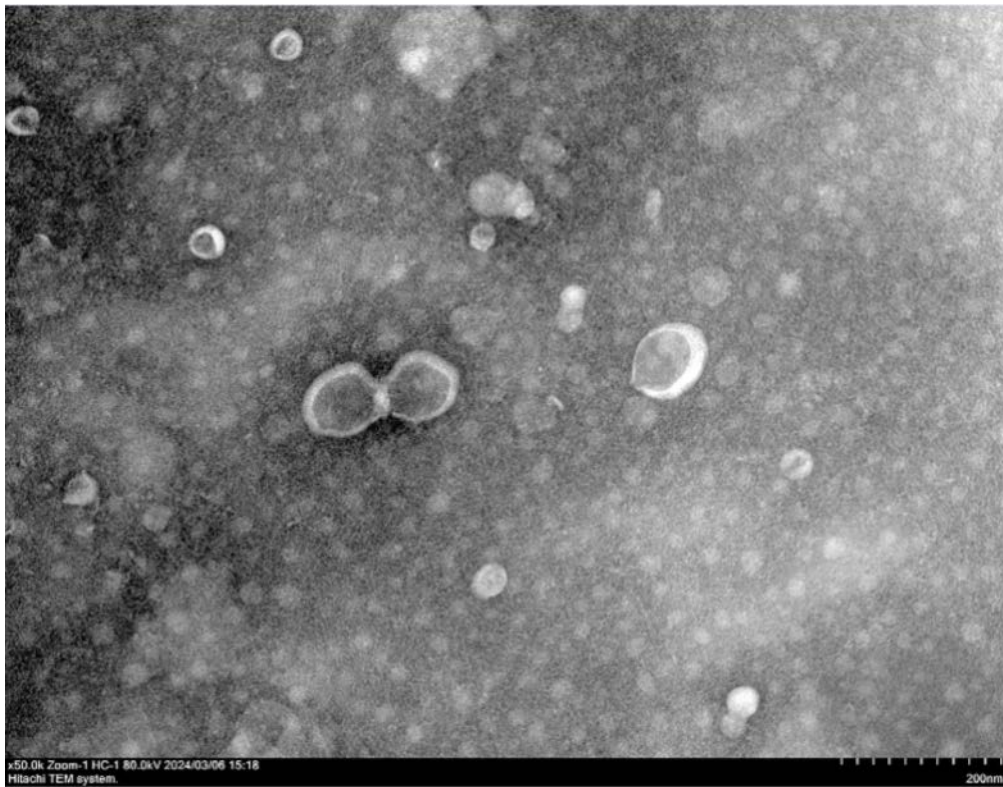


图1

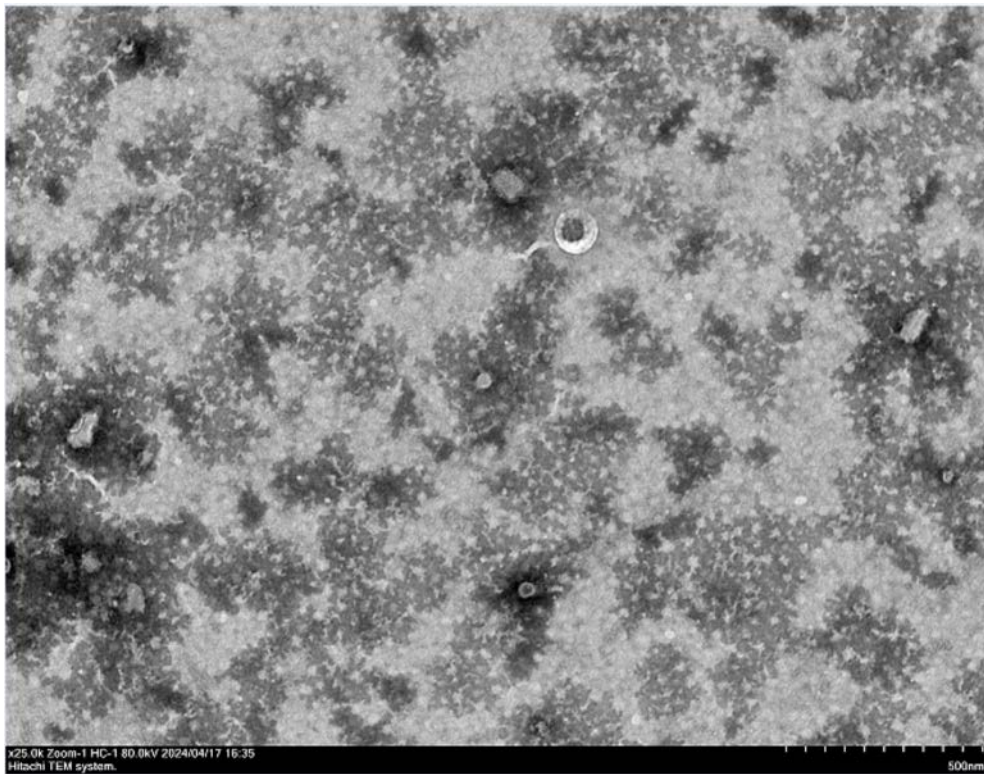


图2