



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119242566 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 03

(21) 申请号 202411787333.3

(22) 申请日 2024.12.06

(71) 申请人 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司

地址 011517 内蒙古自治区呼和浩特市和林格尔盛乐经济园区蒙牛六期

(72) 发明人 母智深 白茹 高增丽 于声波
刘宇 陈云 乌云 曹文慧
王彩霞 云洁

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

专利代理师 孙怡

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010.01)

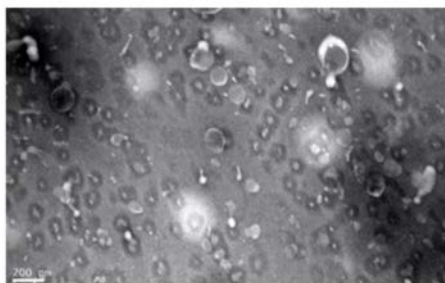
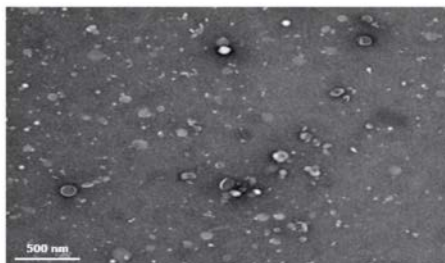
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种制备外泌体的方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及外泌体制备技术领域,具体公开了一种制备外泌体的方法与应用。本发明制备外泌体的方法包括:(1)将脱脂后的动物乳以醋酸-醋酸钠溶液调节pH值至4.5-4.6,分离获得乳清液;(2)将乳清液进行微滤获得透过液;(3)将透过液以NaCl水溶液进行洗滤,使外泌体截留液中蛋白质含量低于 $2\mu\text{g/mL}$,渗透压为280-310mOsm/L;(4)与醋酸-醋酸钠溶液进行混合获得电泳液进行循环式自由流等电聚焦电泳。本发明的方法可更好地保证外泌体的结构完整性,整体收率高,且外泌体纯度高。



1. 一种制备外泌体的方法,以动物乳为原料进行外泌体的制备,其特征在于,包括:

(1) 等电点沉淀分离:

将脱脂后的动物乳,以醋酸-醋酸钠溶液调节pH值至4.5-4.6,充分酸沉完毕后,去除沉淀分离获得乳清液;所述醋酸-醋酸钠溶液中醋酸和醋酸钠的摩尔比为1:(1.4-1.8),醋酸根离子的浓度为0.055-0.075 mol/L;

(2) 微滤:将所述乳清液进行微滤,去除杂质,获得透过液;

(3) 超滤:将所述透过液以NaCl水溶液进行洗滤,获得外泌体截留液;所述外泌体截留液中蛋白质含量低于2 μ g/mL,渗透压为280-310mOsm/L;

(4) 循环式自由流等电聚焦电泳:将所述外泌体截留液与载体两性电解质溶液进行混合获得电泳液进行电泳,收集pH值为4-7的组分;所述载体两性电解质溶液为醋酸-醋酸钠溶液;所述电泳液中外泌体的浓度为 1.5×10^8 - 1×10^{10} 粒/mL,醋酸根离子和钠离子的摩尔比为1:(0.3-0.55),醋酸根离子的浓度为0.02-0.029 mol/L。

2. 根据权利要求1所述的制备外泌体的方法,其特征在于,步骤(1)中,所述醋酸-醋酸钠溶液中醋酸和醋酸钠的摩尔比为1:(1.6-1.62),醋酸根离子的浓度为0.065mol/L;

和/或,步骤(4)中,所述电泳液中外泌体的浓度为 2.5×10^9 粒/mL,醋酸根离子和钠离子的摩尔比为1:(0.42-0.43),醋酸根离子的浓度为0.025-0.026mol/L。

3. 根据权利要求1或2所述的制备外泌体的方法,其特征在于,步骤(2)中,所述微滤时,微滤膜的孔径为0.6~1.0 μ m,温度为4-7 $^{\circ}$ C,压力为2-6bar。

4. 根据权利要求1或2所述的制备外泌体的方法,其特征在于,步骤(3)中,所述超滤时,超滤膜的孔径为200-400kDa,温度为4-7 $^{\circ}$ C,压力为0.05~0.2Mpa;

和/或,所述NaCl水溶液中NaCl的浓度为0.8%-1%。

5. 根据权利要求1或2所述的制备外泌体的方法,其特征在于,步骤(2)中,所述微滤时,微滤膜的孔径为0.8 μ m,温度为6 $^{\circ}$ C,压力为4 bar;

和/或,步骤(3)中,所述超滤时,超滤膜的孔径为300kDa,温度为6 $^{\circ}$ C,压力为0.1Mpa;所述NaCl水溶液中NaCl的浓度为0.9%。

6. 根据权利要求1或2所述的制备外泌体的方法,其特征在于,

步骤(4)中,循环式自由流等电聚焦电泳的压力为300-500V,温度为2-8 $^{\circ}$ C。

7. 根据权利要求6所述的制备外泌体的方法,其特征在于,步骤(4)中,循环式自由流等电聚焦电泳的压力为400V,温度为4 $^{\circ}$ C。

8. 根据权利要求1或2所述的制备外泌体的方法,其特征在于,

步骤(1)中,脱脂后的动物乳中脂肪的含量 $\leq$ 0.05%;

和/或,通过离心去除沉淀分离获得乳清液;所述离心的温度为0-6 $^{\circ}$ C,转速为8000-15000转/min。

9. 权利要求1-8任一项所述的制备外泌体的方法在提升以乳源进行外泌体分离时,外泌体的纯度中的应用。

10. 权利要求1-8任一项所述的制备外泌体的方法在提升以乳源进行外泌体分离时,外泌体的回收率中的应用。

一种制备外泌体的方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及外泌体制备技术领域,具体地说,涉及一种制备外泌体的方法与应用。

背景技术

[0002] 外泌体以脂质双分子层作为保护保证了其内含物的稳定性,并作为一种很有前景的药物递送系统被广泛研究。乳源外泌体在疾病诊断、治疗、预防以及人和动物的生长发育等方面都具有重要的研究价值。其中,牛乳外泌体因其原料丰富且低廉、良好的生物相容性、安全性、低免疫原性、可口服递送等优点备受关注。牛奶样品容易获取,并且不会对奶牛产生负面影响,这为乳源外泌体的研究奠定了基础。外泌体参与多种生物功能并发挥重要作用,被认为是疾病诊断、治疗和预后的重要的生物标志物和药物载体,因此发展简单、高效、经济的外泌体分离、纯化、富集技术有助于疾病的早期诊断和精准治疗。

[0003] 目前常用外泌体的分离方法有超速离心法、尺寸筛分的分离技术(超滤法和尺寸排阻法)、免疫亲和捕获法、试剂盒法和微流体技术等,这些分离方法得到的外泌体存在纯度和/或浓度不高等问题。离心法是最常用的方法,包括差速超速离心法和密度梯度离心法。差速超速离心法是最经典也是使用最多的外泌体提取方法,具有成本低、获得率高等优势,但是存在依赖仪器设备、耗时、容易被污染、分离纯度低而且超高速离心可能破坏外泌体结构,不适合大规模使用。密度梯度离心法与差速超速离心法相比,其获得的外泌体纯度较高,但同样具有耗时、会破坏外泌体结构等缺点。超滤法也是公认的外泌体提取方法,具有快速、高效等优点,但在超滤过程中存在不同超滤膜的选择、囊泡和蛋白质造成的滤孔堵塞、蛋白质污染、可能损失大量外泌体等问题。尺寸排阻法是基于分子尺寸不同的分析物在化学惰性多孔固定相孔隙中保留作用的差异实现分离,分离过程中外泌体损伤少、获得的外泌体纯度很高,但是不适用于从大体积液体中分离外泌体;免疫亲和法利用包被单克隆抗体的磁珠结合外泌体,可用于外泌体某一亚群的提取,特异性较高,但操作耗时、提取效率低、成本高、产出少,且不适用于大量样本,并且,抗体与外泌体一旦结合很难在温和的洗脱条件下进行分离。商用外泌体分离纯化试剂盒因操作简单、节省时间而受到越来越多的关注,大多商用试剂盒使用聚合物共沉淀方法富集外泌体,但商用试剂盒分离出的外泌体纯度较低,而且其中的聚合物难以去除,对后续的分析造成不良影响。微流体技术产量低、纯度低,存在耗时和流程难以标准化及大规模试验等问题。

[0004] 此外,人工抗体材料用于外泌体相关的研究刚刚起步,由于外泌体复杂多样的表面结构,人工抗体与外泌体识别的分子机制尚未清楚阐明,且外泌体通用型配基种类少,特异性配基研发过程专业性强,因此鲜有应用于外泌体分离纯化的人工抗体的报道。

[0005] 外泌体的分离和分析有望取代传统的侵入性体液采集模式(如血液、尿液和脑脊液等),用作疾病早期检测的生物标志物。同时,外泌体不仅本身就是治疗剂,而且还是靶向药物递送和治疗的载体。因此,作为阐明病理生理机制和临床诊疗的重要一环,需不断深入研究外泌体的分子特征、生物功能以及临床应用等,进而对外泌体的分离纯化技术提出了更高的要求。但是体液环境复杂,外泌体浓度低,加之自身体积小,为满足科研和临床的

需求,实现外泌体快速、高效、高纯度、无损耗的分离纯化已成为外泌体研究领域的一大挑战。

发明内容

[0006] 本发明的目的之一在于提供一种可高效从乳源中分离获得高纯度、高收率的外泌体的方法。

[0007] 本发明提供了一种制备外泌体的方法,以动物乳为原料进行外泌体的制备,其包括:

(1) 等电点沉淀分离:

将脱脂后的动物乳,以醋酸-醋酸钠溶液调节pH值至4.5-4.6,充分酸沉完毕后,去除沉淀分离获得乳清液;所述醋酸-醋酸钠溶液中醋酸和醋酸钠的摩尔比为1:(1.4-1.8),醋酸根离子的浓度为0.055-0.075mol/L(优选0.056-0.071mol/L);

(2) 微滤:将所述乳清液进行微滤,去除杂质,获得透过液;

(3) 超滤:将所述透过液以NaCl水溶液进行洗滤,获得外泌体截留液;所述外泌体截留液中蛋白质含量低于2 μ g/mL,渗透压为280-310mOsm/L;

(4) 循环式自由流等电聚焦电泳:将所述外泌体截留液与载体两性电解质溶液进行混合获得电泳液进行电泳,收集pH值为4-7的组分;所述载体两性电解质溶液为醋酸-醋酸钠溶液;所述电泳液中外泌体的浓度为 1.5×10^8 - 1×10^{10} 粒/mL,醋酸根离子和钠离子的摩尔比为1:(0.3-0.55),醋酸根离子的浓度为0.02-0.029mol/L。

[0008] 优选,本发明制备外泌体的方法的步骤(1)中,所述醋酸-醋酸钠溶液中醋酸和醋酸钠的摩尔比为1:(1.6-1.62),更优选为1:0.617,醋酸根离子的浓度为0.065mol/L;

和/或,步骤(4)中,所述电泳液中外泌体的浓度为 2.5×10^9 粒/mL,醋酸根离子和钠离子的摩尔比为1:(0.42-0.43),优选为1:0.423,醋酸根离子的浓度为0.025-0.026mol/L,优选为0.02567mol/L。

[0009] 本发明在分离动物乳中的外泌体时,大致是先通过特定的酸沉法去除动物乳中的酪蛋白,之后再通过微滤去除较大的颗粒和杂质(如,细菌、部分乳脂肪球及较大的悬浮颗粒),接着通过特定超滤对除外泌体外的成分进行进一步去除(如,乳清蛋白),以获得的超滤截留液与特定载体两性电解质溶液混合后进行循环式自由流等电聚焦电泳。

[0010] 具体地,本发明研究发现,在进行酪蛋白酸沉时,使用本领域的常规方法,虽可实现目标蛋白的去除,但不利于保证外泌体的结构完整性,从而即便配合循环式自由流等电聚焦电泳,仍无法获得理想的收率,当改以本发明特定的醋酸-醋酸钠溶液进行pH值调节后,既可兼顾酪蛋白的有效去除,又可提升最终外泌体的回收率。

[0011] 此外,本发明还研究发现,在去除杂质时,先通过微滤去除大尺寸杂质后,若以常规的水进行超滤洗滤,虽可去除小尺寸杂质,但也不利于保证外泌体结构的完整性。而改以本发明的NaCl水溶液进行洗滤,最终对截留液的渗透压和蛋白质浓度进行特定控制后,既可保证杂质的尽量减少,又可避免引入过多的离子,兼顾外泌体结构的保持和后续进行循环式自由流等电聚焦电泳的需求。

[0012] 再者,本发明在进行循环式自由流等电聚焦电泳时,特别选用醋酸-醋酸钠溶液作为载体两性电解质溶液,并对电泳液中的主要物质浓度进行了控制,从而既不额外引入其

它离子,又保证了电泳时外泌体的有效分离,进而可获得纯度高、收率佳的效果。若各主要物质浓度的配合不佳,则无法在电泳介质中形成有效的pH梯度或对外泌体的结构产生破坏。这将导致无法获得有效的纯化结果。

[0013] 本发明中,动物乳为牛乳、羊乳、驼乳、鹿乳、马乳等哺乳动物的乳汁。

[0014] 本发明的动物乳可通过本领域常规方法进行脱脂,如在温度45-50℃(优选45℃),以转速3500-5500转/min(优选4500转/min)进行离心。

[0015] 本发明动物乳在进行脱脂前优选进行常规的净乳操作,如,以离心净乳机,在温度1-10℃(优选4-7℃),转速3500-5500转/min下离心10-20分钟。

[0016] 本发明制备外泌体的方法的步骤(2)中,所述微滤时,微滤膜的孔径为0.6~1.0μm,温度为4-7℃,压力为2-6bar。

[0017] 本发明制备外泌体的方法的步骤(3)中,所述超滤时,超滤膜的孔径为200-400kDa,温度为4-7℃,压力为0.05~0.2Mpa;

以本发明的微滤和超滤条件进行处理,有利于保证最终外泌体的纯度和回收率(降低对外泌体结构的影响)。若微滤和超滤时的温度过高,或者微滤和超滤压力、孔径配合不佳,均会降低外泌体的纯度和/或回收率。因此,优选使用本发明的上述处理条件。

[0018] 本发明制备外泌体的方法的步骤(3)中,所述NaCl水溶液中NaCl的浓度为0.8%-1%。

[0019] 本发明中,以NaCl水溶液进行洗滤时,本领域技术人员可根据常识对NaCl水溶液的浓度和用量进行调整,以同时将截留液的渗透压和蛋白质浓度控制到本发明的限定为准。例如,若NaCl水溶液的浓度较高,则可适当减少NaCl水溶液的用量,在控制蛋白质浓度的同时,避免渗透压过大;若NaCl水溶液的浓度较低,则可适当增加NaCl水溶液的用量,以在渗透压适宜的前提下,更充分地洗去杂质。

[0020] 更优选,本发明制备外泌体的方法的步骤(2)中,所述微滤时,微滤膜的孔径为0.8μm,温度为6℃,压力为4 bar;

和/或,步骤(3)中,所述超滤时,超滤膜的孔径为300kDa,温度为6℃,压力为0.1Mpa;所述NaCl水溶液中NaCl的浓度为0.9%。

[0021] 本发明制备外泌体的方法的步骤(4)中,循环式自由流等电聚焦电泳的压力为300-500V,聚焦期间分离腔的温度为2-8℃。

[0022] 优选,本发明制备外泌体的方法的步骤(4)中,循环式自由流等电聚焦电泳的压力为400V,温度为4℃。

[0023] 温度对于外泌体的结构有所影响,且也会影响两性电解质的解离程度和缓冲能力,本领域技术人员可根据常识进行选用,优选使用本发明的循环式自由流等电聚焦电泳条件,其可很好地与特定电泳液配合,实现理想的外泌体分离效果。

[0024] 本发明的电泳中,通过阳极电解液和阴极电解液的不断循环流动来提供并维持稳定的电泳电压,本领域技术人员可根据常识进行阳极电解液和阴极电解液的选择,以及电泳液和阳极电解液、阴极电解液的循环泵速,以保证电泳可实现为准(如,将电泳液的循环泵速设置为1-3 ml/min,将阳极电解液、阴极电解液的循环泵速设置为2-4 ml/min,设置电泳液的循环泵速低于阳极电解液、阴极电解液的循环泵速)。

[0025] 本发明的循环式自由流等电聚焦电泳终点的判断方法为本领域常识,即当电流下

降到1-5mA,30min内变动在 ± 1 mA时,说明等电聚焦已完成,可进行目标物收集。

[0026] 本发明制备外泌体的方法的步骤(1)中,脱脂后的动物乳中脂肪的含量 $\leq 0.05\%$,有利于后续电泳的进行。

[0027] 本发明制备外泌体的方法的步骤(1)中,通过本领域常规离心方法去除沉淀分离获得乳清液;优选,所述离心的温度为0-6°C,更优选为4°C,转速为8000-15000转/min,更优选为10000转/min。

[0028] 本发明还提供上述制备外泌体的方法在提升以乳源进行外泌体分离时,外泌体的纯度中的应用。

[0029] 本发明还提供上述制备外泌体的方法在提升以乳源进行外泌体分离时,外泌体的回收率中的应用。

[0030] 本发明的有益效果至少在于:

本发明的方法可大规模处理原料,适用于动物乳中外泌体的工业化富集,整个方法回收率高(在70%以上),获得的外泌体纯度高(80-99%),能够降低外泌体的生产成本。

附图说明

[0031] 图1为本发明实施例3循环式自由流等电聚焦电泳后收集到的pH值为4-7的组分的代表性透射电镜图。

具体实施方式

[0032] 下面将结合实施例对本发明的优选实施方式进行详细说明。需要理解的是以下实施例的给出仅是为了起到说明的目的,并不是用于对本发明的范围进行限制。本领域的技术人员在不背离本发明的宗旨和精神的情况下,可以对本发明进行各种修改和替换。

[0033] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到或按本领域常规方法制备。

[0034] 实施例1

本实施例提供一种制备外泌体的方法,具体如下:

1、净乳

将10L生牛乳,采用离心净乳机处理,处理温度为4°C,转速为4500转/min,时间为10min。

[0035] 2、离心分离

采用离心分离机离心,离心温度为45°C;转速为4500转/min,获得脂肪含量0.05%的脱脂奶。

[0036] 3、等电点沉淀分离

在步骤2的脱脂奶中,逐滴加入醋酸-醋酸钠溶液(醋酸根离子的浓度为0.056mol/L,醋酸和醋酸钠的摩尔比为1:1.408),调节pH至4.5(溶液渗透压为293mOsm/L),酸沉1小时后采用离心分离机离心,离心温度为6°C,转速为15000转/min,时间2小时,得到乳清液。

[0037] 4、微滤

将乳清液进行微滤,获得澄清的透过液。微滤膜的孔径为0.6 μ m,微滤的温度为4°C,压力为2bar。

[0038] 5、超滤

采用超滤膜将透过液以NaCl水溶液(0.8%)进行洗滤处理,至截留液中蛋白含量低于 $2\mu\text{g/mL}$,渗透压为 289mOsm/L 。

[0039] 超滤膜孔径为 400kDa ,超滤温度控制在 4°C ,压力为 0.2MPa ;

6、循环式自由流等电聚焦电泳(FFIEF)

A、将截留液与载体两性电解质溶液(醋酸-醋酸钠溶液)进行混合获得电泳液。电泳液中外泌体浓度为 1.5×10^8 粒/ mL ,醋酸根离子和钠离子的摩尔比为 $1:0.323$;醋酸根离子的浓度为 0.02065mol/L 。

[0040] B、设置恒压为 300V 、电泳液泵速为 3mL/min 、阳极缓冲溶液($100\text{mM H}_3\text{PO}_4$)和阴极缓冲溶液(100mM NaOH)的泵速为 4 mL/min ,开始将电泳液进行RFFIEF分离聚焦,聚焦期间分离腔温度设置为 8°C 。RFFIEF往复循环,至电流降到 3mA , 30min 内变动在 $\pm 1\text{mA}$ 之时结束,收集pH值为4-7的组分。

[0041] 实施例2

本实施例提供一种制备外泌体的方法,具体如下:

1、净乳

将 10L 生牛乳,采用离心净乳机处理,处理温度为 4°C ,转速为 4500转/min ,时间为 10min 。

[0042] 2、离心分离

采用离心分离机离心,离心温度为 45°C ;转速为 4500转/min ,获得脂肪含量 0.05% 的脱脂奶。

[0043] 3、等电点沉淀分离

在步骤2的脱脂奶中,逐滴加入醋酸-醋酸钠溶液(醋酸根离子的浓度为 0.071mol/L ,醋酸和醋酸钠的摩尔比为 $1:1.786$),调节pH至 4.6 (溶液渗透压为 308mOsm/L),酸沉 1小时 后采用离心分离机离心,离心温度为 0°C ,转速为 8000转/min ,时间 2小时 ,得到乳清液。

[0044] 4、微滤

将乳清液进行微滤,获得澄清的透过液。微滤膜的孔径为 $1\mu\text{m}$,微滤的温度为 7°C ,压力为 6bar 。

[0045] 5、超滤

采用超滤膜将透过液以NaCl水溶液(1%)进行洗滤处理,至截留液中蛋白含量低于 $2\mu\text{g/mL}$,渗透压为 281mOsm/L 。

[0046] 超滤膜孔径为 200kDa ,超滤温度控制在 7°C ,压力为 0.05MPa ;

6、循环式自由流等电聚焦电泳(FFIEF)

A、将截留液与载体两性电解质溶液(醋酸-醋酸钠溶液)进行混合获得电泳液。电泳液中外泌体浓度为 1×10^{10} 粒/ mL ,醋酸根离子和钠离子的摩尔比为 $1:0.523$;醋酸根离子的浓度为 0.02875mol/L 。

[0047] B、设置恒压为 500V 、电泳液泵速为 1mL/min 、阳极缓冲溶液($100\text{mM H}_3\text{PO}_4$)和阴极缓冲溶液(100mM NaOH)的泵速为 3 mL/min ,开始将电泳液进行RFFIEF分离聚焦,聚焦期间分离腔温度设置为 2°C 。RFFIEF往复循环,至电流降到 3mA , 30min 内变动在 $\pm 1\text{mA}$ 之时结束,收集pH值为4-7的组分。

[0048] 实施例3

本实施例提供一种制备外泌体的方法,具体如下:

1、净乳

将10L生牛乳,采用离心净乳机处理,处理温度为5℃,转速为4500转/min,时间为10min。

[0049] 2、离心分离

采用离心分离机离心,离心温度为45℃;转速为4500转/min,获得脂肪含量0.05%的脱脂奶。

[0050] 3、等电点沉淀分离

在步骤2的脱脂奶中,逐滴加入醋酸-醋酸钠溶液(醋酸根离子的浓度为0.065mol/L,醋酸和醋酸钠的摩尔比为1:1.617),调节pH至4.6(溶液渗透压为301mOsm/L),酸沉1小时后采用离心分离机离心,离心温度为4℃,转速为10000转/min,时间2小时,得到乳清液。

[0051] 4、微滤

将乳清液进行微滤,获得澄清的透过液。微滤膜的孔径为0.8μm,微滤的温度为6℃,压力为4bar。

[0052] 5、超滤

采用超滤膜将透过液以NaCl水溶液(0.9%)进行洗滤处理,至截留液中蛋白含量低于2μg/mL,渗透压为283mOsm/L。

[0053] 超滤膜孔径为300kDa,超滤温度控制在6℃,压力为0.1Mpa;**6、循环式自由流等电聚焦电泳(FFIEF)**

A、将截留液与载体两性电解质溶液(醋酸-醋酸钠溶液)进行混合获得电泳液。电泳液中外泌体浓度为 2.5×10^9 粒/mL,醋酸根离子和钠离子的摩尔比为1:0.423;醋酸根离子的浓度为0.02567mol/L。

[0054] B、设置恒压为400V、电泳液泵速为2mL/min、阳极缓冲溶液(100mM H_3PO_4)和阴极缓冲溶液(100mM NaOH)的泵速为3 mL/min,开始将电泳液进行RFFIEF分离聚焦,聚焦期间分离腔温度设置为4℃。RFFIEF往复循环,至电流降到3mA,30min内变动在±1mA之时结束,收集pH值为4-7的组分。

[0055] 对比例1

本对比例提供一种制备外泌体的方法,具体与实施例1基本相同,区别仅在于,步骤(1)中,改以醋酸溶液进行pH值的调整,并在加入醋酸的同时加入NaCl,使酸沉体系的渗透压维持在293mOsm/L之间。

[0056] 对比例2

本对比例提供一种制备外泌体的方法,具体与实施例1基本相同,区别仅在于,步骤(4)中,将外泌体截留液与醋酸-醋酸钠溶液进行混合,使电泳液中外泌体的浓度为 2.5×10^{11} 粒/mL,醋酸根离子和钠离子的摩尔比和醋酸根离子的浓度与实施例1相同。

[0057] 对比例3

本对比例提供一种制备外泌体的方法,具体与实施例1基本相同,区别仅在于,步骤(4)中,将外泌体截留液与醋酸-醋酸钠溶液进行混合,使电泳液中外泌体的浓度和醋酸根离子的浓度与实施例1相同,醋酸根离子和钠离子的摩尔比改为1:0.21。

[0058] 对比例4

本对比例提供一种制备外泌体的方法,具体与实施例1基本相同,区别仅在于,步骤(4)中,改为使用磷酸氢二钠-柠檬酸溶液作为载体两性电解质溶液,电泳液中外泌体的浓度与实施例1相同,磷酸氢二钠和柠檬酸的摩尔比为1:1.335,钠离子的浓度为0.671mol/L。

[0059] 对比例5

本对比例提供一种制备外泌体的方法,具体与实施例1基本相同,区别仅在于,步骤(4)中,改为使用Tris-甘氨酸溶液作为载体两性电解质溶液,电泳液中外泌体的浓度与实施例1相同,三(羟甲基)甲基甘氨酸(TRIS)的浓度为0.0088mol/L,甘氨酸的浓度为0.0112mol/L。

[0060] 实验例

本实验例对上述实施例和对比例的外泌体制备效果进行评价,具体先基于TEM鉴定分析组分颗粒形态技术,对各例的待测样品进行TEM成像分析,观察发现透射电镜下30~150nm的颗粒具有外泌体的典型形态学特征——多呈杯状圆形或类圆形的膜性小囊泡,且可见囊泡的双膜性结构,中央为低电子密度成分、分布较集中且边界清晰。典型观察结果如图1所示,之后根据如下方法进行外泌体纯度和回收率的检测,结果见表1:

1、采用NTA方法对各例中步骤5获得外泌体截留液中的外泌体浓度(粒径在30~150nm之间的颗粒的总浓度)进行检测,计为A1(粒/mL)。

[0061] 2、采用NTA方法对各例中步骤6获得外泌体产品中所含颗粒的粒径分布情况及各粒径颗粒的浓度进行检测,根据粒径分布图,选出粒径在30~150nm的颗粒,将它们的颗粒浓度进行加和计为A2(粒/mL);将所有粒径的颗粒的浓度进行加和获得总颗粒浓度计为A3(粒/mL)。

[0062] 具体检测方法参见:人源间充质干细胞外泌体制备与检验规范,T/FDSA 0049-2024,团体标准。

[0063] 3、计算外泌体纯度和回收率,公式如下:

外泌体纯度=A2/A3 ×100%;外泌体回收率=A2/A1 ×100%。

[0064] 表1

	外泌体纯度	外泌体回收率
实施例1	80.3%	70.4%
实施例2	95.3%	73.7%
实施例3	98.7%	78.4%
对比例1	69.8%	38.2%
对比例2	60.1%	39.8%
对比例3	65.1%	34.3%
对比例4	72.6%	49.2%
对比例5	10.4%	6.1%

[0065] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

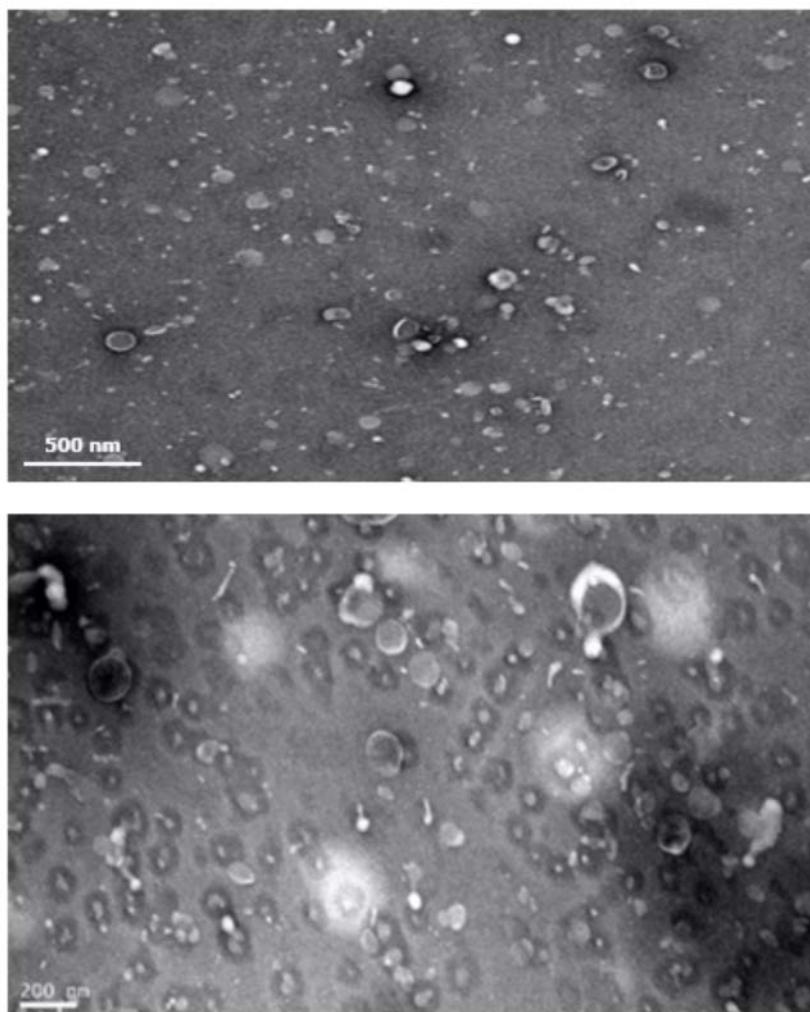


图1