(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114471163 B
(45)授权公告日 2024.12.06

(21)申请号 202111520737.2
(22)申请日 2021.12.13
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114471163 A
(43)申请公布日 2022.05.13
(73)专利权人 宁波甬恒瑶瑶智能科技有限公司
地址 315000 浙江省宁波市镇海区庄市街道中官西路1277号启迪科技园A座508室
(72)发明人 何加铭 李思 杨茗予
(74)专利代理机构 宁波甬致专利代理有限公司 33228
专利代理师 李迎春
(51)Int.Cl.
B01D 61/18(2006.01)
B01D 61/14(2006.01)
C12M 1/12(2006.01)
(56)对比文件
CN 216604777 U,2022.05.27
审查员 苏玮韬

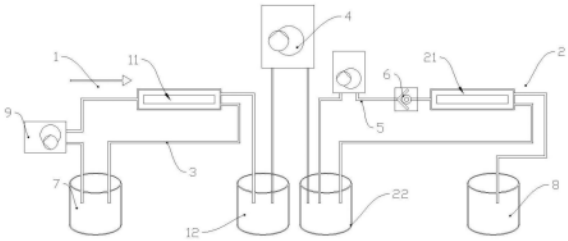
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤装置及方法

(57)摘要

本发明提供了一种二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤装置,包括以及通过管路连接的第一级切向流超滤系统、第二级切向流超滤系统、蠕动泵和循环泵,所述蠕动泵和循环泵用于驱动所述超滤装置内部的液体流动;且所述第一级切向流超滤系统和所述第二级切向流超滤系统内分别设置有第一过滤膜以及第二过滤膜,所述第二过滤膜的过滤孔孔径小于所述第一过滤膜的过滤孔孔径。本发明还提供一种二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法,包括对待提取液的循环超滤,最终制得高纯度的外泌体,本发明有较高的推广价值与商业价值。



CN 114471163 B

1.一种二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法,其特征在于,采用超滤装置进行超滤,所述超滤装置包括通过管路(3)依次连通的第一级切向流超滤系统(1)、第一蠕动泵(4)以及第二级切向流超滤系统(2),所述第一蠕动泵(4)用于驱动所述第一级切向流超滤系统(1)内部的液体流至所述第二级切向流超滤系统(2);

且所述第一级切向流超滤系统(1)内设置有第一过滤膜(11),所述第二级切向流超滤系统(2)内设置有第二过滤膜(21),所述第一过滤膜(11)与所述第二过滤膜(21)通过所述第一蠕动泵(4)相连通;所述第二过滤膜(21)的过滤孔孔径小于所述第一过滤膜(11)的过滤孔孔径;

所述超滤方法包括以下步骤:

S1:将含外泌体的待提取液通入至管路(3)中,所述待提取液流经第一级切向流超滤系统(1)的第一过滤膜进行初次过滤得到过滤液;所述第一过滤膜的过滤孔孔径大于所述外泌体;

S2:步骤S1的过滤液流经第二级切向流超滤系统(2)的第二过滤膜进行再次过滤进行富集和浓缩,得到被第二过滤膜(21)过滤后的过滤液以及纯化后的外泌体富集液;所述第二过滤膜(21)的过滤膜孔径小于所述外泌体;

S3:将步骤S2中得到的外泌体富集液进行再次循环超滤,最终在第二级切向流超滤系统(2)内得到纯化浓缩后的外泌体富集液。

2.根据权利要求1所述的二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法,其特征在于,所述第一过滤膜(11)的过滤孔孔径大于等于0.18μm,所述第二过滤膜(21)的过滤孔孔径小于等于0.03μm;且所述的第一过滤膜以及第二过滤膜均为盒式平板膜。

3.根据权利要求1所述的二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法,其特征在于,所述第一级切向流超滤系统(1)内设置有一过滤液容器(12),所述第二级切向流超滤系统(2)内设置有一富集液容器(22),且所述过滤液容器(12)与所述第一过滤膜(11)下游通过所述管路(3)连通,所述富集液容器(22)与所述第二过滤膜(21)的上游和下游通过所述管路(3)连通,使得液体在所述超滤装置流动时,通过所述第一过滤膜(11)的液体流入所述过滤液容器(12)中,未通过所述第二过滤膜(21)的液体流入富集液容器(22)中。

4.根据权利要求3所述的二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法,其特征在于,所述富集液容器(22)与所述第二过滤膜之间设置有一单向阀(6)和一个循环泵(5),且该单向阀(6)的流向为从所述富集液容器(22)至所述第二过滤膜,所述循环泵(5)用于驱动所述第二级切向流超滤系统(2)内部的液体循环流动。

5.根据权利要求4所述的二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法,其特征在于,所述第二过滤膜(21)出口端与一回收容器(8)相连通,所述回收容器(8)用于回收经过所述循环泵(5)循环结束后通过所述第二过滤膜(21)的液体。

6.根据权利要求1所述的二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法,其特征在于,所述第一过滤膜(11)的进口端的所述管路(3)与一待提取液容器(7)相连通;使得液体在所述超滤装置流动时,未通过所述第一过滤膜(11)的液体流入所述待提取液容器(7)中。

7.根据权利要求6所述的二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法,其特征在于,所述第一级切向流超滤系统(1)内设置有一第二蠕动泵(9),且所述第二蠕动泵的进

口与所述待提取液容器(7)相连通,所述第二蠕动泵的出口与所述第一过滤膜(11)的进口端相连通;所述第二蠕动泵用于驱动所述待提取液容器(7)内的液体流至所述第一级切向流超滤系统(1)。

8.根据权利要求1所述的二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法,其特征在于,所述步骤S1中,所述含外泌体的待提取液为细胞培养基上清液。

9.根据权利要求1所述的二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法,其特征在于,所述步骤S3中,循环超滤在所述第二级切向流超滤系统(2)内进行,具体为:在步骤S2处理后,通过将所述富集液通入至第二级切向流超滤系统(2)内进行再次超滤,且所述再次超滤的次数大于等于1次。

二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤装置及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体而言,涉及一种二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤装置及方法。

背景技术

[0002] 目前,外泌体的分离富集提取方法主要靠人工操作,主要技术方法包括离心、沉淀、超滤、免疫亲和及微流控等,随着科学技术的发展和人们健康观念和追求美的观念的普及,外泌体市场需求变大,传统外泌体分离技术方法规模化提取分离与纯化受限产能不足,造成外泌体供不应求,因此外泌体规模化生产迫在眉睫。

[0003] 超速离心一直被视为分离提取外泌体的金标准。该方法根据沉降系数、大小和形状多次差速离心来进行分离得到外泌体。先收集间充质干细胞(MSC)培养基上清液,先在4℃条件下,300g-500g离心10分钟,得到上清液1和沉淀1,这一步骤是为了去除活细胞;接下来对上清液1在4℃条件下2000g离心10～20分钟,去除死细胞,得到上清液2和沉淀2;对上清液2进行离心,离心条件为4℃,10,000g,20～30分钟,得到上清液3和沉淀3,这一步是为了去除细胞碎片;接下来对上清液3进行离心,离心条件为4℃,100,000g,70～120分钟,得到上清液4和沉淀4,这一步是为了去除囊泡结构;之后对上清液4进行离心,离心条件为4℃,100,000g,70～120分钟,得到上清液5和沉淀5,沉淀5即为外泌体。接下来使用PBS重悬外泌体,即可得到外泌体悬液。该项技术耗时大约5～6个小时。

[0004] 由于当前外泌体分离提取多为人工操作,整个分离提取过程繁琐,历经时间较长,现有自动分离提取设备产量低,耗时长,成本高,难以满足市场需求。各外泌体商家迫切需要一套能够快速、大量获取高纯度外泌体制备平台。例如超速离心法,过程繁琐,耗时耗力,对操作人员经验依懒性强,收集结果重复性差,回收率低,限制了其在外泌体工业化生产和临床应用;亲和层析、离子交换层析等层析法具备一定的工业纯化生产中,虽然可对目标纯化物进行定量、浓度检测等,但受制于层析柱的对进料样品的PH、缓冲和电导率以及纯化物自身的等电点等参数要求,在工业化进程中具有一定的局限性;免疫磁珠法和微流控法成本较高,经济性差,技术要求较高,适于微量纯化操作,难以大规模制备等问题。

[0005] 此外,随着生物技术领域进展,为了生物药商业化生产,一些能够使用细胞培养基上清液等粗生物产品溶液来分离纯化得到目标产物的技术也逐步开始使用。例如基于亲和力的亲和层析方法。基于亲和力的层析以目标产物与固态基质以部分特异性相互作用为基础来分离生物分子。因此,目标产物与固态基质特异性结合,其他不能结合的非特异性组分从系统中流出。之后洗脱层析柱就能够收获目标产物。尽管亲和层析能够产生高度特异并能够产生非常纯的产物,但亲和层析所用的填料是其他材料的10多倍。并且维护、更换、工艺开发、检测也是一笔明显的支出成本。

[0006] 此外传统的死端过滤技术,是将料液置于膜的上游,再压力差的推动下,水和小于膜孔的颗粒透过膜。大于膜孔的颗粒则被膜截留。死端过滤的缺陷是随着时间的增加,膜面上堆积的颗粒也在增加,过滤阻力增大,膜渗透速率下降。因此,死端过滤是间歇式的,必须

周期性的停下来清洗膜表面的污染层,或者更换膜。而且只适用于通量比较小、固含量较低的液体过滤。切向流过滤适用于较大规模的料液过滤,液体流动在过滤截至表面产生剪切力,减小了滤饼层或凝胶层的堆积,保证了稳定的过滤速度。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是提供一种二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤装置,以解决目前传统方法分离纯化和浓缩外泌体时操作复杂、需要频繁维护以及成本高的问题。

[0008] 为解决上述问题,本发明提供一种二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤装置,其特征在于,包括通过管路依次连通的第一级切向流超滤系统、第一蠕动泵以及第二级切向流超滤系统,所述第一蠕动泵用于驱动所述第一级切向流超滤系统内部的液体流至所述第二级切向流超滤系统;且所述第一蠕动泵不起过滤作用,外泌体能够通过第一蠕动泵;

[0009] 且所述第一级切向流超滤系统内设置有第一过滤膜,所述第二级切向流超滤系统内设置有第二过滤膜所述第一过滤膜与所述第二过滤膜通过所述管路相连通;,所述第二过滤膜的过滤孔孔径小于所述第一过滤膜的过滤孔孔径。

[0010] 作为优选的方案,所述第一过滤膜的过滤孔孔径大于等于0.18μm,所述第二过滤膜的过滤孔孔径小于等于0.03μm。

[0011] 作为优选的方案,所述的第一过滤膜以及第二过滤膜均为盒式平板膜。

[0012] 作为优选的方案,所述第一级切向流超滤系统内设置有一过滤液容器,所述第二级切向流超滤系统内设置有一富集液容器,且所述过滤液容器与所述第一过滤膜游通过所述管路连通,所述富集液容器与所述第二过滤膜的上游和下游通过所述管路连通,使得液体在所述超滤装置流动时,通过所述第一过滤膜的液体流入所述过滤液容器中,未通过所述第二过滤膜的液体流入富集液容器中。

[0013] 作为优选的方案,所述富集液容器与所述第二过滤膜之间设置有一单向阀和一个循环泵,且该单向阀的流向为从所述富集液容器至所述第二过滤膜,所述循环泵用于驱动所述第二级切向流超滤系统内部的液体循环流动。第一蠕动泵能够驱动管路内的液体进行流动,将待提取液从管路中引入至第一级切向流超滤系统、第二级切向流超滤系统内进行超滤。

[0014] 循环泵设置在第二级切向流超滤系统内,能够驱动液体在所述第二级切向流超滤系统内多次超滤,以提高外泌体的提取率,同时提高浓缩和纯化外泌体的效果。

[0015] 作为优选的方案,所述富集液容器与所述第二过滤膜之间设置有一单向阀,且该单向阀的流向为从所述富集液容器至所述第二过滤膜。使得循环泵与第一蠕动泵工作过程中,管路内的液体无法从第二过滤膜回流至富集液容器,避免了由于回流给富集液带来的纯度的影响。

[0016] 作为优选的方案,所述第二过滤膜出口端与一回收容器相连通,所述回收容器用于回收经过所述循环泵循环结束后通过所述第二过滤膜的液体。

[0017] 作为优选的方案,所述第一过滤膜的进口端的所述管路与一待提取液容器相连通;使得液体在所述超滤装置流动时,未通过所述第一过滤膜的液体流入所述待提取液容

器中。

[0018] 作为优选的方案,所述第一级切向流超滤系统内设置有一第二蠕动泵,且所述第二蠕动泵的进口与所述待提取液容器相连通,所述第二蠕动泵的出口与所述第一过滤膜的进口端相连通;所述第二蠕动泵用于驱动所述待提取液容器内的液体流至所述第一级切向流超滤系统。

[0019] 本发明中,切向流过滤(TFF)技术,能够高效、快速的进行生物分子的分离与纯化处理,能够对低至数十毫升,高达数千升的样品溶液进行浓缩和脱盐处理,也可用于大小不同的生物分子的分离、细胞悬液的收集、以及发酵液和细胞裂解液中的细胞和细胞碎片的去除和澄清。切向流过滤,是指液体流动方向与过滤方向垂直的过滤形式。液体流动在过滤介质表面产生剪切力,减小了滤饼层和凝胶层的堆积,从而保证了稳定的过滤速度。并且本发明中的切向流超滤系统能够大规模、快速的分离纯化并且进行浓缩含有外泌体的干细胞培养基上清液,并且本发明的系统能够以一种无污染的方式进行。通过本发明能够有效地将含有外泌体的待提取液中的外泌体分离以及浓缩纯化,且操作简单,成本较低,浓缩得到的外泌体也易于收集,能够连续地对外泌体进行浓缩;本发明的装置能够以无损、无污染、均质性、高通量的方式直接分离纯化以及浓缩含有外泌体的细胞培养基上清液,具有较高的商业价值与推广价值。

[0020] 本发明要解决的另一个技术问题是:提供一种二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法,以解决目前常规方法操作繁琐、成本高的问题。

[0021] 本发明采用如下方案:一种二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法,采用上述超滤装置进行超滤。

[0022] 作为优先的方案,包括以下步骤:

[0023] S1:将含外泌体的待提取液通入至管路中,所述待提取液流经第一级切向流超滤系统的第一过滤膜进行初次过滤得到过滤液,除去死细胞、细胞碎片、大囊泡等杂质;所述第一过滤膜的过滤孔孔径大于所述外泌体;

[0024] S2:步骤S1的过滤液流经第二级切向流超滤系统的第二过滤膜进行再次过滤进行富集和浓缩,得到被第二过滤膜过滤后的富集液以及纯化后的外泌体;所述第二过滤膜的过滤膜孔径小于所述外泌体。

[0025] 外泌体能够穿过第一级切向流超滤系统上的超滤膜,穿过第一级切向流超滤系统的薄膜后,外泌体位于第一级切向流超滤系统的滤液中。外泌体不能够穿过第二级切向流超滤系统上的超滤膜。

[0026] S3:通过循环泵驱动外泌体富集液进行再次循环超滤,最终在第二超滤系统内得到纯化浓缩后的外泌体富集液。

[0027] 作为优选的方案,所述步骤S1中,所述含外泌体的待提取液为细胞培养基上清液。

[0028] 作为优选的方案,所述步骤S3中,循环泵的驱动在所述第二切向流超滤系统内进行,具体为:在步骤S2处理后,将所述富集液通入至第二切向流超滤系统内进行再次超滤,且所述再次超滤的次数大于等于1次。外泌体位于第二级切向流超滤系统中的样品池中,样品池中的液体可以循环一定次数,该循环操作由第二级切向流超滤系统上的循环泵控制。

[0029] 本发明的二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法能够有效地对含外泌体的待提取液进行超滤,分离待提取液内的外泌体至第二切向流超滤系统内,且本发明

设置的循环系统能够多次反复地对设备内部的液体进行多次超滤,本发明的方法能够以无损、无污染、均质性、高通量的方式直接分离纯化以及浓缩含有外泌体的待提取液;最终制备获得的外泌体含量较高,且超滤方法简单易于操作,无需繁琐的设备和多次的人工操作,适合进行商业化的推广,具有较高的经济价值。

附图说明

[0030] 图1为本发明的结构示意图;

[0031] 图2为本发明的管路内液体流向图;其中箭头代表管路内液体流向;

[0032] 附图标记说明:

[0033] 1、第一级切向流超滤系统;11、第一过滤膜;12、过滤液容器;2、第二级切向流超滤系统;21、第二过滤膜;22、富集液容器;3、管路;4、第一蠕动泵;5、循环泵;6、单向阀;7、待提取液容器;8、回收容器;9、第二蠕动泵。

具体实施方式

[0034] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更为明显易懂,下面结合附图对本发明的具体实施例做详细的说明。

[0035] 实施例1:

[0036] 如图1、图2所示,本实施例提供一种二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤装置,包括由管路3依次连接的第一级切向流超滤系统1、第一蠕动泵4和第二级切向流超滤系统2,且所述第二级切向流超滤系统2内设置有一循环泵5;所述第一蠕动泵4和循环泵5用于驱动所述超滤装置内部的液体流动,具体地,所述第一蠕动泵4用于驱动液体,将液体从装有带提取液的容器中引入管路3内部,之后继续驱动其流经第一级切向流超滤系统1、第二级切向流超滤系统2中;

[0037] 所述第一级切向流超滤系统1内设置有第一过滤膜以及一过滤液容器12,所述第二级切向流超滤系统2内设置有第二过滤膜以及一富集液容器22,所述第一过滤膜与所述第二过滤膜均为盒式平板膜,所述第一过滤膜11且所述过滤液容器12设置在所述第一过滤膜11下游,所述富集液容器22设置在所述第二过滤膜下游;所述所述第二过滤膜的过滤孔孔径小于所述第一过滤膜的过滤孔孔径;使得外泌体能够穿过第一级切向流超滤系统1上的超滤膜,穿过第一级切向流超滤系统1的薄膜后,外泌体位于第一级切向流超滤系统1的滤液中。外泌体不能够穿过第二级切向流超滤系统2上的超滤膜,外泌体位于第二级切向流超滤系统2中的富集液容器22中,经过多次循环后收集到一起,得到浓缩纯化后的外泌体。

[0038] 本发明的切向流超滤系统中的滤膜不做品牌要求,能够符合本发明的滤膜要求为,孔径范围符合前文所述(第一级切向流超滤系统1的滤膜孔径范围为大于等于0.18μm,第二级切向流超滤系统2的滤膜孔径范围为小于等于0.03μm)能够耐受的pH范围为pH7.6±0.6,低蛋白吸附,高化学耐受力。将待提取液通过具有大于等于0.18μm孔径的第一级切向流超滤系统1,进行除杂以及降低污染物。第一蠕动泵4将收集到的第一级切向流超滤系统1的滤液通入具有小于等于0.03μm之间孔径的第二级切向流超滤系统2,进行浓缩以及富集。

[0039] 所述第一过滤膜11的进口端的所述管路3通过第二蠕动泵9与一待提取液容器7相连通,所述第二蠕动泵用于驱动液体从所述待提取液容器7中离开通入管路,进入第一过滤

膜11中;所述第二过滤膜21出口端与一回收容器8相连通,。

[0040] 所述第二过滤膜21出口端连接有两条管路,一条与富集液容器22相连通,一条与回收容器8连通;所述第一过滤膜11的出口端也同样与两条管路相连通,且一条与过滤液容器12相连通另一条与待提取液容器7相连通。在装置运行过程中,第一过滤膜11将大颗粒杂质等物质过滤,通过管路,直接流入过滤液容器12中;过滤后包含外泌体的溶液进一步受到第一蠕动泵4的驱动,流入第二过滤膜21中,由于外泌体的直径大于第二过滤膜21的过滤孔孔径,外泌体被截留在第二过滤膜21上部,过滤后的液体流入回收容器8中,被截留的外泌体最终排向富集液容器22中。

[0041] 所述第一蠕动泵4设置在所述第一级切向流超滤系统1与所述第二级切向流超滤系统2之间,具体地,设置在所述过滤液容器12与所述第二过滤膜21之间,且所述第一蠕动泵4不起过滤作用,外泌体能够通过第一蠕动泵4;

[0042] 所述富集液容器22与所述第二过滤膜之间设置有一单向阀6,且该单向阀6的流向为从所述富集液容器22至所述第二过滤膜。使得循环泵5与第一蠕动泵4工作过程中,管路3内的液体无法从第二过滤膜回流至富集液容器22,避免了由于回流给富集液带来的纯度的影响。

[0043] 所述循环泵5设置在第二级切向流超滤系统2内,所述循环泵5用于驱动所述第二级切向流超滤系统2内部的液体循环流动。所述循环泵5具体设置所述第二过滤膜21与所述单向阀6的上游,且所述循环泵5与所述第二过滤膜21之间设置有单向阀6,驱动液体在所述富集液容器22以及第二过滤膜21之间多次循环,能够驱动液体在所述第二级切向流超滤系统2内多次超滤,最终提高超滤的外泌体提取率,提高浓缩与纯化外泌体的效果;第二级切向流超滤系统2中的液体可以循环一定次数,该操作由第二级切向流超滤系统2上的循环泵5控制。

[0044] 实施例2:

[0045] 本实施例提供一种二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法,如图2的流程图所示,主要包括以下步骤:

[0046] S1:将含外泌体的待提取液通过第二蠕动泵9驱动通入至管路3中,所述待提取液流经第一级切向流超滤系统1的第一过滤膜进行初次过滤得到过滤液,除去死细胞、细胞碎片、大囊泡等杂质;所述第一过滤膜的过滤孔孔径大于所述外泌体;过滤液流入过滤液容器12中;所述含外泌体的待提取液为细胞培养基上清液;

[0047] S2:步骤S1的过滤液通过第一蠕动泵4的驱动从过滤液容器12中被继续通入下游的第二级切向流超滤系统2中,流经第二级切向流超滤系统2的第二过滤膜进行再次过滤进行富集和浓缩,得到被第二过滤膜过滤后的富集液以及纯化后的外泌体,富集液流入富集液容器22中;所述第二过滤膜的过滤膜孔径小于所述外泌体。

[0048] 且所述第一过滤膜的过滤孔孔径为0.18μm,所述第二过滤膜的过滤孔孔径为0.03μm;

[0049] 外泌体能够穿过第一级切向流超滤系统1上的超滤膜,穿过第一级切向流超滤系统1的薄膜后,外泌体位于第一级切向流超滤系统1的滤液中。外泌体不能够穿过第二级切向流超滤系统2上的超滤膜。

[0050] S3:富集液容器22中的富集液通过循环泵5的作用进行再次循环超滤,最终在第二

超滤系统的富集液容器22内得到纯化浓缩后的外泌体富集液。

[0051] 实施例3：

[0052] 本实施例提供一种二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法，如图2的流程图所示，主要包括以下步骤：

[0053] S1：将含外泌体的待提取液通过第二蠕动泵9驱动通入至管路3中，所述待提取液流经第一级切向流超滤系统1的第一过滤膜进行初次过滤得到过滤液，除去死细胞、细胞碎片、大囊泡等杂质；所述第一过滤膜的过滤孔孔径大于所述外泌体；过滤液流入过滤液容器12中；所述含外泌体的待提取液为细胞培养基上清液；

[0054] S2：步骤S1的过滤液通过第一蠕动泵4的驱动从过滤液容器12中被继续通至下游管路3中，流经第二级切向流超滤系统2的第二过滤膜进行再次过滤进行富集和浓缩，得到被第二过滤膜过滤后的富集液以及纯化后的外泌体，富集液流入富集液容器22中；所述第二过滤膜的过滤膜孔径小于所述外泌体。

[0055] 且所述第一过滤膜的过滤孔孔径为0.20μm，所述第二过滤膜的过滤孔孔径为0.01μm；

[0056] 外泌体能够穿过第一级切向流超滤系统1上的第一过滤膜11，穿过第一级切向流超滤系统1的第一过滤膜11后，外泌体位于第一级切向流超滤系统1的过滤液容器12中。外泌体不能够穿过第二级切向流超滤系统2上的第二过滤膜21，外泌体流经第二过滤膜21后，留在第二过滤膜21上。

[0057] S3：富集液容器22中的富集液通过循环泵5的作用进行再次循环超滤，最终在第二超滤系统的富集液容器22内得到纯化浓缩后的外泌体富集液。

[0058] 实施例3：

[0059] 本实施例提供一种二次两级切向流分离纯化和浓缩外泌体的超滤方法，如图2的流程图所示，主要包括以下步骤：

[0060] S1：将含外泌体的待提取液通过第二蠕动泵9驱动通入至管路3中，所述待提取液流经第一级切向流超滤系统1的第一过滤膜进行初次过滤得到过滤液，除去死细胞、细胞碎片、大囊泡等杂质；所述第一过滤膜的过滤孔孔径大于所述外泌体；过滤液流入过滤液容器12中；所述含外泌体的待提取液为细胞培养基上清液；

[0061] S2：步骤S1的过滤液通过第一蠕动泵4的驱动从过滤液容器12中被继续通至下游的第二级切向流超滤系统2中，流经第二级切向流超滤系统2的第二过滤膜进行再次过滤进行富集和浓缩，得到被第二过滤膜过滤后的富集液以及纯化后的外泌体，富集液流入富集液容器22中；所述第二过滤膜的过滤膜孔径小于所述外泌体。

[0062] 且所述第一过滤膜的过滤孔孔径为0.19μm，所述第二过滤膜的过滤孔孔径为0.02μm；

[0063] 外泌体能够穿过第一级切向流超滤系统1上的超滤膜，穿过第一级切向流超滤系统1的薄膜后，外泌体位于第一级切向流超滤系统1的滤液中。外泌体不能够穿过第二级切向流超滤系统2上的超滤膜。

[0064] S3：富集液容器22中的富集液通过循环泵5的作用进行再次循环超滤，最终在第二超滤系统的富集液容器22内得到纯化浓缩后的外泌体富集液。

[0065] 通过本发明上述实施例1的装置以及实施例2-4的方法制备获得的外泌体富集液

能够将细胞培养基上清液浓缩至原体积的0.5%-80%;能够将外泌体的含量提升至未分离纯化前的1.25～200倍数,本发明能够对未处理的细胞培养基进行预处理,进行除杂和浓缩操作,可以将该实施例1的装置安装在分离纯化制备外泌体的最上游,本发明能够将分离纯化、富集浓缩等操作实现自动化处理较多的待提取液,且分离纯化的纯度较高,具有较高的商业价值。

[0066] 虽然本公开披露如上,但本公开的保护范围并非仅限于此。本领域技术人员,在不脱离本公开的精神和范围的前提下,可进行各种变更与修改,这些变更与修改均将落入本发明的保护范围。

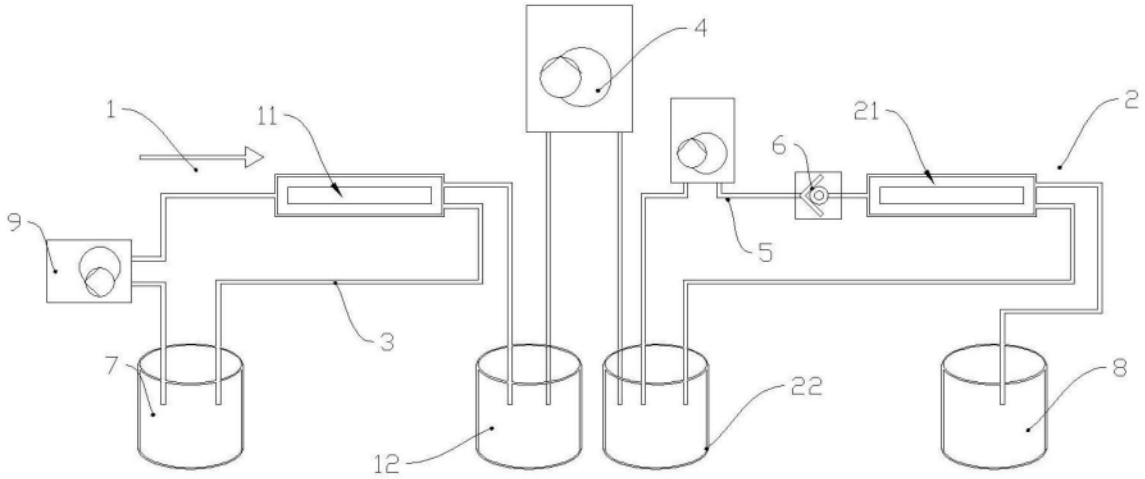


图1

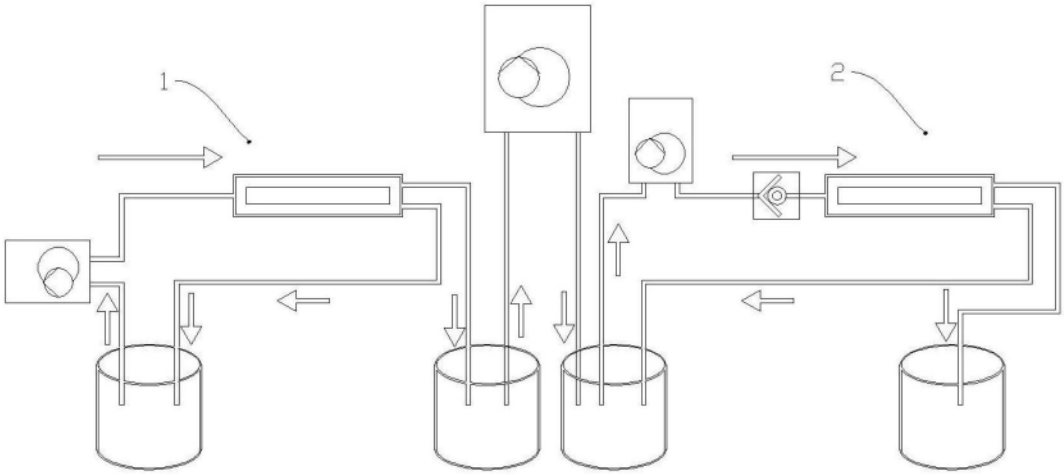


图2