



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113101737 B

(45) 授权公告日 2023. 09. 15

(21) 申请号 202110240790.0

(22) 申请日 2021.03.04

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113101737 A

(43) 申请公布日 2021.07.13

(73) 专利权人 京美生命科技(杭州)有限公司  
地址 中国(浙江)自由贸易试验区杭州市滨江区长河街道滨安路658号2幢2楼215室

(72) 发明人 张海心

(74) 专利代理机构 北京华清迪源知识产权代理有限公司 11577  
专利代理师 丁彦峰

(51) Int. Cl.

B01D 36/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 112251320 A, 2021.01.22

CN 108841788 A, 2018.11.20

CN 109266606 A, 2019.01.25

CN 110499287 A, 2019.11.26

CN 111304049 A, 2020.06.19

EP 3360955 A1, 2018.08.15

US 2020276540 A1, 2020.09.03

US 6268487 B1, 2001.07.31

北京农业大学主编. 现代液相色谱仪. 《仪器分析》. 农业出版社, 1987, 第197页.

审查员 江涵

权利要求书2页 说明书7页 附图7页

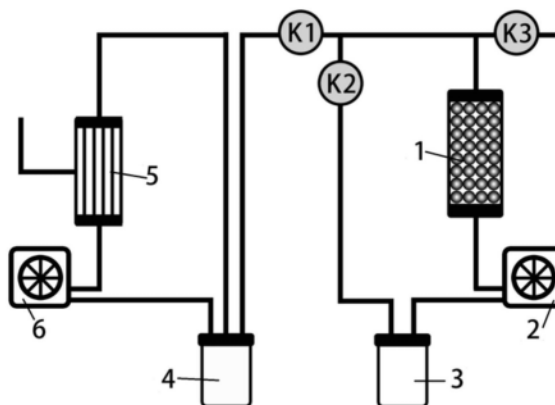
(54) 发明名称

一种亲和切向流过滤系统及其构建方法和外泌体提取方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种亲和切向流过滤系统及其构建方法和外泌体提取方法及应用。所述提取方法包括：将所述含外泌体的样本溶液与亲和液充分混合置于第一储存罐中，打开开关K2，断开开关K1、K3，开启第一蠕动泵，流经Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱，循环流动；对Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱进行洗涤、洗脱后；打开开关K1，关闭开关K3、K2，将溶液泵入第二储存罐中，打开第二蠕动泵，让溶液经过滤装置，循环浓缩过滤至最小运行体积；加入无菌PBS缓冲液，循环浓缩过滤，即得提取纯化的外泌体溶液。本发明可用于大体积复杂样本外泌体提取制备，操作方便，提取效率高，外泌体纯度高，产量多，生物学活性高，可实现复杂样本外泌体的批量自动化提取，具有极大的商业价值。

CN 113101737 B



1. 一种应用亲和切向流过滤系统提取外泌体的方法,其特征在于,过滤系统包括:第一储存罐、第二储存罐、Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱、过滤装置、第一蠕动泵、第二蠕动泵和三个开关K1、K2、K3;

其中,第一储存罐的出口经第一蠕动泵与Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱的入口连接,Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱的出口分别通过开关K1、K2、K3的开闭来控制柱内的液体流向,其中开关K1、K2关闭时,开开关K3,液体流出体系,开关K1、K3关闭时,开开关K2,液体循环流回第一储存罐,开关K2、K3关闭时,开开关K1,液体经第二储存罐的入口进入第二储存罐;第二储存罐的出口经第二蠕动泵与过滤装置的入口连接,过滤装置的出口与第二储存罐的第二入口连接,经过滤装置过滤后的液体直接流出体系;

其中,所述过滤装置是设有切向流过滤膜F的过滤体系,所述切向流过滤膜F的截留分子量为50-750kD;

所述方法包括以下步骤:

步骤一,将样本溶液进行预处理,得含外泌体的样本溶液;

步骤二,将所述含外泌体的样本溶液与亲和液充分混合,并置于第一储存罐中,打开开关K2,断开开关K1、K3,开启第一蠕动泵,让溶液流经Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱,并循环流动2-5h;

步骤三,断开开关K1、K2,打开开关K3,将第一储存罐的液体排出后,再向第一储存罐中加入洗涤液,冲洗后洗涤液排出;

步骤四,打开开关K2,关闭开关K3、K1,向第一储存罐中加入洗脱液进行洗脱,循环洗脱反应20-60min;

步骤五,打开开关K1,关闭开关K3、K2,将溶液泵入第二储存罐中,打开第二蠕动泵,让溶液经过滤装置,循环浓缩过滤至最小运行体积;加入无菌PBS缓冲液,循环浓缩过滤,即得提取纯化的外泌体溶液;

所述Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱为蛋白交联纳米亲和微球为蛋白与纳米微球偶联物的结合体;其中,所述蛋白为生物素标记的Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白;所述纳米微球偶联物为链霉亲和素偶联的直径为200-2000nm的纳米羧基硅胶微球;将制备的Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球装入色谱柱,并盖上顶盖,制得Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱;

所述Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球的制备方法包括以下步骤:将Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白加入活性生物素,4℃孵育1-24h,再用脱盐柱去除游离的生物素,用PBS缓冲液洗脱,得到生物素标记的Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白;再将生物素标记的Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白加入链霉亲和素偶联的纳米羧基硅胶微球中,反应0.5-3h后,离心得沉淀,所述沉淀即为Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球;

所述链霉亲和素偶联的纳米羧基硅胶微球的制备方法为:将DMF(N,N-二甲基甲酰胺)加入MES缓冲液洗涤纳米羧基硅胶微球中,充分混匀得到混合液;将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加入N-羟基琥珀酰亚胺加入所述混合液中,混匀,离心弃上清,得第一沉淀物;将所述链霉亲和素溶液加入第一沉淀物中,室温混合,离心,得第二沉淀物;将封闭液加入到所述第二沉淀物中,混合反应,离心,得到链霉亲和素偶联纳米羧基硅胶微球;

所述亲和液包括HEPES、CaCl<sub>2</sub>、NaCl和MgCl<sub>2</sub>;所述洗涤液包括Tris-HCl、NaCl、CaCl<sub>2</sub>和

MgCl<sub>2</sub>;所述洗脱液包括Tris-HCl、NaCl和EDTA。

2. 根据权利要求1所述一种应用亲和切向流过滤系统提取外泌体的方法,其特征在于,所述样本预处理的方法是将样本加入离心管中,5000-12000g,离心5-50min,取上清液,过0.22-0.45 $\mu$ m滤膜过滤除菌。

3. 根据权利要求1所述一种应用亲和切向流过滤系统提取外泌体的方法,其特征在于,所述样本溶液包括植物和动物来源的体液,包括血清、血浆、尿液、牛奶或富血小板的血浆;也包括不同来源的细胞,包括植物细胞,动物体细胞及其干细胞的培养上清液。

4. 根据权利要求1所述一种应用亲和切向流过滤系统提取外泌体的方法,其特征在于,所述过滤装置的最小运行体积为50-500mL。

## 一种亲和切向流过滤系统及其构建方法和外泌体提取方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体涉及一种亲和切向流过滤系统及其构建方法和外泌体提取方法及应用。

### 背景技术

[0002] 外泌体是有活细胞分泌的磷脂双分子层结构的小囊泡,直径在30-150nm,可存在于各种体液中,如血清、血浆、唾液、尿液,腹水、脊髓液、乳汁等。外泌体中含有多种生物分子,如mRNA、miRNA、蛋白质、脂质等,可以传递给受体细胞,从而改变受体细胞的生理功能或病理功能。近几年,外泌体作为细胞间的信息传递工具及各种疾病的生物标志物而引起广泛的关注,外泌体具有在生物医药及疾病诊断领域的应用开发潜力。

[0003] 针对外泌体的提取纯化没有一个统一的标准,常用的方法有很多种,超速离心法、密度梯度离心法,超滤法,聚合物沉淀法,免疫捕获法等。超速离心法虽然是公认的外泌体提取的“金标准”方法,但是操作费时费力、高度依赖人工,回收率低,外泌体形态大小不一,高速离心会损害外泌体而影响下游实验。密度梯度离心法虽然可以获得很纯的外泌体,但该方法操作繁琐,重复性差,耗时很长,回收率低,不适合大批量提取外泌体。超滤法可以方便快速的提取外泌体,但该方法提取的外泌体中含有大颗粒杂质污染,严重影响下游应用。聚合物沉淀法提取的外泌体中杂蛋白污染多,颗粒形态不均一,影响下游分析。免疫捕获法虽然可以特异性地捕获外泌体,获得的外泌体纯度高,但该方法成本高且产量低,不能提取样本中所有的外泌体,只能提取某种表面抗原阳性的外泌体。但是,血清,血浆,牛奶等成分复杂的样本,由于溶液中含有大量的颗粒物质,如载脂蛋白,脂颗粒等,可对外泌体造成严重污染,而目前的众多方法中,还没有针对此类样品的外泌体批量提取方法。

[0004] 综上所述,急需一种操作方便,提取效率高,获得的外泌体纯度高,可以适合大体积复杂样本的外泌体提取纯化方法。

### 发明内容

[0005] 为此,本发明提供一种亲和切向流过滤系统及其构建方法和外泌体提取方法及应用,以解决现有技术中操作复杂、提取效率低、样本量小、提取的外泌体纯度低、重复性差等问题。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0007] 根据本发明的第一方面提供的一种用于外泌体提取的亲和切向流过滤系统,所述过滤系统包括:第一储存罐、第二储存罐、Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱、过滤装置、第一蠕动泵、第二蠕动泵和三个开关K1、K2、K3;

[0008] 其中,第一储存罐的出口经第一蠕动泵与Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱的入口连接,Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱的出口分别通过开关K1、K2、K3的开闭来控制柱内的液体流向,其中开关K1、K2关闭时,开开关K3,液体流出体系,开关K1、K3

关闭时,开开关K2,液体循环流回第一储存罐,开关K2、K3关闭时,开开关K1,液体经第二储存罐的入口进入第二储存罐;第二储存罐的出口经第二蠕动泵与过滤装置的入口连接,过滤装置的出口与第二储存罐的第二入口连接,经过滤装置过滤后的液体直接流出体系;

[0009] 其中,所述过滤装置是设有切向流过滤膜F的过滤体系,所述切向流过滤膜F的截留分子量为50-750kD。

[0010] 根据本发明的第二方面提供一种应用亲和切向流过滤系统提取外泌体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0011] 步骤一,将样本溶液进行预处理,得含外泌体的样本溶液;

[0012] 步骤二,将所述含外泌体的样本溶液与亲和液充分混合,并置于第一储存罐中,打开开关K2,断开开关K1、K3,开启第一蠕动泵,让溶液流经Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱,并循环流动2-5h;

[0013] 步骤三,断开开关K1、K2,打开开关K3,将第一储存罐的液体排出后,再向第一储存罐中加入洗涤液,冲洗后洗涤液排出;

[0014] 步骤四,打开开关K2,关闭开关K3、K1,向第一储存罐中加入洗脱液进行洗脱,循环洗脱反应20-60min;

[0015] 步骤五,打开开关K1,关闭开关K3、K2,将溶液泵入第二储存罐中,打开第二蠕动泵,让溶液经过滤装置,循环浓缩过滤至最小运行体积;加入无菌PBS缓冲液,循环浓缩过滤,即得提取纯化的外泌体溶液;

[0016] 其中,所述过滤体系设有切向流过滤膜F的过滤体系,所述切向流过滤膜F的截留分子量为50-750kD。

[0017] 进一步的,所述样本预处理的方法是将样本加入离心管中,5000-12000g,离心5-50min,取上清液,过0.22-0.45 $\mu$ m滤膜过滤除菌。

[0018] 进一步的,所述样本溶液包括植物和动物来源的体液,包括血清、血浆、尿液、牛奶或富血小板的血浆;也包括不同来源的细胞,包括植物细胞,动物体细胞及其干细胞的培养上清液。

[0019] 进一步的,所述Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱为蛋白交联纳米亲和微球为蛋白与纳米微球偶联物的结合体;其中,所述蛋白为生物素标记的Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白;所述纳米微球偶联物为链霉亲和素偶联的直径为200-2000nm的纳米羧基硅胶微球;将制备的Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球装入色谱柱,并盖上顶盖,制得Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱。

[0020] 进一步的,所述Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球的制备方法包括以下步骤:将Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白加入活性生物素,4 $^{\circ}$ C孵育1-24h,再用脱盐柱去除游离的生物素,用PBS缓冲液洗脱,得到生物素标记的Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白;再将生物素标记的Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白加入链霉亲和素偶联的纳米羧基硅胶微球中,反应0.5-3h后,离心得沉淀,所述沉淀即为Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球。

[0021] 进一步的,所述链霉亲和素偶联的纳米羧基硅胶微球的制备方法为:将DMF(N,N-二甲基甲酰胺)加入MES缓冲液洗涤纳米羧基硅胶微球中,充分混匀得到混合液;将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加入N-羟基琥珀酰亚胺加入所述混合液中,混匀,离心弃上清,得第一沉淀物;将所述链霉亲和素溶液加入第一沉淀物中,室温混合,离心,得第

二沉淀物；将封闭液加入到所述第二沉淀物中，混合反应，离心，得到链霉亲和素偶联纳米羧基硅胶微球。

[0022] 进一步的，所述亲和液包括HEPES、CaCl<sub>2</sub>、NaCl和MgCl<sub>2</sub>；所述洗涤液包括Tris-HCl、NaCl、CaCl<sub>2</sub>和MgCl<sub>2</sub>；所述洗脱液包括Tris-HCl、NaCl和EDTA。

[0023] 进一步的，所述过滤装置的最小运行体积为50-500mL。

[0024] 根据本发明的第三方面提供的上述方法制备的外泌体，可在医美类产品、促进伤口愈合的外泌体液体敷料、缓解哮喘及急性呼吸窘迫症的外泌体喷雾的制备以及外泌体相关的生物制品制备中的应用。

[0025] 本发明具有如下优点：

[0026] 本发明提供了用于大体积复杂样本外泌体提取制备纯化的亲和切向流过滤系统及制备方法与应用，该方法可对各种样本来源的外泌体提取纯化，特别适合提取大体积复杂样本的外泌体。亲和切向流过滤系统操作方便，提取效率高，获得的外泌体纯度高，产量多，还能保证其生物学活性及完整性，该系统可实现复杂样本外泌体的批量自动化提取，具有极大的商业价值。

## 附图说明

[0027] 为了更清楚地说明本发明的实施方式或现有技术中的技术方案，下面将对实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。显而易见地，下面描述中的附图仅仅是示例性的，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据提供的附图引伸获得其它的实施附图。

[0028] 本说明书所绘示的结构、比例、大小等，均仅用以配合说明书所揭示的内容，以供熟悉此技术的人士了解与阅读，并非用以限定本发明可实施的限定条件，故不具技术上的实质意义，任何结构的修饰、比例关系的改变或大小的调整，在不影响本发明所能产生的功效及所能达成的目的下，均应仍落在本发明所揭示的技术内容得能涵盖的范围内。

[0029] 图1为本发明1提供的为本发明提供的一种双重切向流过滤系统的结构图，1为Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联纳米亲和微球柱，2为第一蠕动泵，3为第一储存罐，4为第二储存罐，5为过滤装置，6为第二蠕动泵；

[0030] 图2为本发明实施例提供的Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白交联亲和微球制备流程示意图，其中，A：纳米羧基硅胶微球；B：链霉亲和素；C：链霉亲和素偶联的纳米羧基硅胶微球；D：Reprotide<sup>TM</sup>511；E：活化的生物素；F：生物素标记的Reprotide<sup>TM</sup>511；G：蛋白交联纳米亲和微球；

[0031] 图3为本发明实施例提供的TFF法提取纯化外泌体原理示意图；

[0032] 图4为本发明提供的亲和切向流过滤法提取的外泌体电镜检测结果图；

[0033] 图5为本发明提供的超速离心法提取的外泌体电镜检测结果图；

[0034] 图6为本发明提供的超滤法提取的外泌体电镜检测结果图；

[0035] 图7为本发明采用BSA蛋白定量检测不同提取方法制得外泌体蛋白浓度检测结果图；

[0036] 图8为本发明通过NTA检测不同提取方法制得外泌体数量的检测结果图；

[0037] 图9为本发明提供的亲和切向流过滤法提取的外泌体粒径分布结果图；

- [0038] 图10为本发明提供的超速离心法提取的外泌体粒径分布结果图；
- [0039] 图11为本发明提供的超滤法提取的外泌体粒径分布结果图；
- [0040] 图12为本发明提供的外泌体相对纯度检测结果图；
- [0041] 图13为本发明提供的外泌体溶液ApoB蛋白ELISA检测结果图；
- [0042] 图14为本发明采用Western Blot检测CD9,CD63,ALIX,ApoB标志蛋白结果图,其中(1)为亲和切向流过滤法制备的外泌体结果图,(2)为超速离心法制备的外泌体结果图,(3)为超滤法制备的外泌体结果图。

## 具体实施方式

[0043] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。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前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0044] 实施例1蛋白交联纳米亲和微球的制备

[0045] 1、链霉亲和素偶联纳米羧基硅胶微球的制备:

[0046] 取1mL直径1 $\mu$ m纳米微球至离心管中,该纳米微球的直径范围为200nm-2000nm,本实施例中,以1 $\mu$ m微球为例,先将上述纳米微球10000g离心10min,弃上清,得到沉淀物,向沉淀物加入5mL MES缓冲液混匀,以10000g离心10min,弃上清,然后将微球沉淀物重悬在4.5mL的DMF(N,N-二甲基甲酰胺)溶液中,确保微球被均匀分散,得到微球混合液。其中,MES缓冲液为pH=6.0的0.01-0.5M MES溶液。

[0047] 取1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐2mg,N-羟基琥珀酰亚胺9mg,加入微球混合液中,室温混匀1h后10000g离心10min,弃上清,用无菌水洗涤2遍,得到第一沉淀物。取链霉亲和素2mg加入1mL MES溶液中,充分混匀,再将链霉亲和素溶液加至第一沉淀物中活化微球中,室温混匀2h,10000g离心10min,弃上清,得到第二沉淀物,加入2mL 40mM的乙醇胺封闭液混合反应1h,最后10000g离心10min,弃上清,PBS缓冲液洗涤2遍,即得链霉亲和素偶联纳米羧基硅胶微球。

[0048] 2、生物素标记的Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白的制备

[0049] 取生物素标记物NHS-PEG2-Biotin 1mg加入106 $\mu$ l的DMSO中,配置成10mM的生物素标记物NHS-PEG2-Biotin的母液。向体积0.1mL浓度1mg/mL的Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白溶液中加入0.25 $\mu$ l生物素标记物NHS-PEG2-Biotin的母液,充分混匀,4 $^{\circ}$ C反应1h。

[0050] 采用脱盐柱去除游离的生物素,分别将生物素标记的Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白加入脱盐柱中,脱盐柱采用PD MiniTrap<sup>TM</sup>G25 Desalting Column,用0.4mL PBS缓冲液洗涤一次,最后加入0.4mL PBS缓冲液洗脱生物素标记化蛋白并收集液体。

[0051] 3、蛋白交联纳米亲和微球的制备:

[0052] 取生物素标记的Reprotide<sup>TM</sup>511蛋白1mL,分别加入100mg的链霉亲和素偶联纳米羧基硅胶微球中,反应30min,离心得沉淀,即为蛋白交联纳米亲和微球。

[0053] 实施例2一种用于外泌体提取的亲和切向流过滤系统提取外泌体的方法

[0054] 1.样本预处理:

[0055] 来自辽宁省血液中心的健康人血液,加人一定比例的抗凝剂(抗凝剂:血液=1:

9),再颠倒混匀,经3000g离心10min后,所得的上清液即为血浆样本。

[0056] 将血浆样本至于离心管中,4℃条件下10000g离心30min,收集离心管的上清液,再通过0.22μm膜过滤后备用。

[0057] 2. 血浆外泌体的提取:

[0058] (1) 亲和切向流过滤系统提取外泌体:

[0059] 取13mL的Reprotide™511蛋白交联纳米亲和微球装入色谱柱,用无菌的30mLPBS缓冲液冲洗,盖上顶盖,与蠕动泵,储存罐,开关阀门等元件,组成图1所示装置。

[0060] 将250mL血浆样本与125mL亲和液混合,并加入储存罐(3)中,打开开关K2,断开K1、K3,打开蠕动泵(2),让溶液流经Reprotide™511蛋白交联纳米亲和微球柱,并循环流动2-5h,再断开开关K2,打开K3,将液体排出,再向储存罐(3)中加入250mL洗涤液,冲洗一次。关闭K3、K1,打开K2,向储存罐(3)中250mL加入洗脱液进行洗脱,循环反应20-60min。再关闭K3、K2,打开K1,将溶液泵入储存罐(4)中,打开蠕动泵(6),让溶液流经TFF膜,循环流动至最小运行体积(50mL-500mL),最后加入500mL的PBS缓冲液,进行浓缩纯化至50mL,最终得到大量高纯度的外泌体。

[0061] 所述的亲和液组分为:15-25mM HEPES、20-30mM CaCl<sub>2</sub>、1-5mM NaCl、1-5mM MgCl<sub>2</sub>、pH为7.2-7.5。洗涤液组分为:20-30mM Tris-HCl、5-15mM NaCl、1-5mM CaCl<sub>2</sub>、1mM-5mM MgCl<sub>2</sub>、pH为7.2-7.5。洗脱液组分为:20-30mM Tris-HCl、1-5mM NaCl、5-10mM EDTA、pH为7.2-7.5。

[0062] 实施例3一种用于外泌体提取制备的亲和切向流过滤系统

[0063] 所述的亲和切向流过滤系统包含了Reprotide™511蛋白交联纳米亲和微球装入色谱柱1、过滤系统5、第一蠕动泵2、第二蠕动泵6、第一储存罐3、第二储存罐4、开关K1、K2、K3。

[0064] 其中,第一储存罐的出口经第一蠕动泵与Reprotide™511蛋白交联纳米亲和微球柱的入口连接,Reprotide™511蛋白交联纳米亲和微球柱的出口分别通过开关K1、K2、K3的开闭来控制柱内的液体流向,其中开关K1、K2关闭时,开开关K3,液体流出体系,开关K1、K3关闭时,开开关K2,液体循环流回第一储存罐,开关K2、K3关闭时,开开关K1,液体经第二储存罐的入口进入第二储存罐;第二储存罐的出口经第二蠕动泵与过滤装置的入口连接,过滤装置的出口与第二储存罐的第二入口连接,经过滤装置过滤后的液体直接流出体系。

[0065] 具体的,第一储存罐3经第一蠕动泵2与Reprotide™511蛋白交联纳米亲和微球装入色谱柱1相连,样本溶液经第一蠕动泵泵入Reprotide™511蛋白交联纳米亲和微球装入色谱柱1再经开关K2流回第一储存罐3中,形成闭环,Reprotide™511蛋白交联纳米亲和微球装入色谱柱1与开关K3相连可无外泌体溶液泵出,Reprotide™511蛋白交联纳米亲和微球装入色谱柱1与开关K1相连可将外泌体溶液泵入第二储存罐4,第二储存罐4与第二蠕动泵6和过滤装置5相连形成闭环,可将外泌体溶液进一步浓缩纯化,无外泌体溶液从过滤装置的流出口流出。

[0066] 对比例1超速离心法提取外泌体

[0067] 将5mL预处理后血浆样本加至超速离心管中,4℃条件下100000g离心2h,用1mL的PBS缓冲液进行重悬,即得到超速离心分离纯化的外泌体。

[0068] 对比例2超滤法提取外泌体

[0069] 取5mL预处理后的血浆样本加至截留分子量为100KD的超滤离心管中,4℃条件下



6000g离心30min,向超滤离心管中加入1mL的PBS缓冲液,用移液器吹打混匀2min后,吸入新的无菌离心管,即得到超滤法提取的外泌体。

[0070] 实验例不同外泌体提取纯化方法对比

[0071] (1)外泌体电镜对比

[0072] 取5 $\mu$ L外泌体溶液置载样铜网上,加50 $\mu$ L1%戊二醛液固定外泌体,反应5min后,用ddH<sub>2</sub>O洗涤铜网,去除戊二醛,再将铜网放在50 $\mu$ L草酸双氧铀液滴上,反应5min后,用滤纸上吸去多余液体,待铜网干燥后,将其放在样品盒里,80kV下拍摄电镜照片。如图4-6可见,三种方法提取的外泌体,电镜下都可见茶托状的双层囊泡结构,粒径大小在30-150nm范围内,且结构清晰,但超速离心法和超滤法提取的外泌体可以明显看到有不规则形状的杂质,而外泌体纯化系统提取的外泌体背景干净,无杂质残留。

[0073] (2)外泌体蛋白定量对比

[0074] 采用BCA法检测外泌体的蛋白浓度,将收集的外泌体溶液中加入等体积的RIPA裂解液(50mM Tris,150mM NaCl,1%NP-40,0.5%脱氧胆酸钠,pH为7.4)充分混匀,4 $^{\circ}$ C静置30min,裂解处理后的外泌体蛋白溶液按照BCA检测试剂盒说明书的操作要求进行外泌体蛋白浓度测定。实验结果如图7可见,超速离心法和超滤法提取的外泌体,其蛋白浓度高于亲和切向流过滤系统3倍多,可能超速离心法和超滤法提取的外泌体中含有更多的蛋白杂质。

[0075] (3)外泌体浓度、粒径分布及纯度对比

[0076] 采用纳米粒径示踪分析仪对外泌体浓度及粒径分布进行检测。如图8可见,亲和切向流过滤系统提取的外泌体略低于超速离心法和超滤法。由于纳米粒径示踪分析仪对外泌体的定量没有特异性,外泌体溶液中的非外泌体颗粒物质也可以被记录。推测超速离心法和超滤法提取的外泌体中可能含有大量粒径较大的颗粒蛋白。外泌体的粒径分布如图9、图10、图11可见,亲和切向流过滤系统提取的外泌体平均粒径为102nm,超速离心法和超滤法提取的外泌体的平均粒径偏大,分别为125.2nm和133.4nm。

[0077] 根据外泌体的颗粒浓度和蛋白浓度的比值,可以简单比较外泌体的相对纯度(颗粒浓度与蛋白浓度的比值越大,其外泌体的纯度越高)。如图12可见,亲和切向流过滤系统提取的外泌体,其浓度蛋白的比值明显高于其他方法,说明亲和切向流过滤系统得到的外泌体纯度更高,超速离心法提取的外泌体中可能含有大量的污染蛋白。

[0078] (4)血浆外泌体中载脂蛋白浓度检测

[0079] 由于血浆含有大量的颗粒物质,如(低密度脂蛋白,乳糜微粒等),其颗粒数量有可能被纳米粒径示踪分析仪记录,所以需要对外泌体中的载脂蛋白进行检测。本研究采用ApoB(人源)ELISA试剂盒对外泌体溶液中ApoB的含量进行检测。如图13所示,亲和切向流过滤系统提取的外泌体中ApoB蛋白含量为0.07mg/mL,几乎没有ApoB蛋白的污染,而超速离心法和超滤法提取的外泌体溶液中的ApoB蛋白含量分别为2.43mg/mL和2.21mg/mL,说明这两种方法提取的外泌体被大量的ApoB蛋白污染。

[0080] (5)外泌体Western Blot实验

[0081] 将得到的外泌体分别加入适量的loading buffer,沸水浴加热使蛋白充分变性,将变性蛋白加样至SDS-PAGE胶的加样孔,电泳分离蛋白样本并进行转膜。转膜完毕后,把蛋白膜放置5%封闭液中封闭。封闭完成后,一抗(CD9、CD63、ALIX)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,再用酶标二抗室温孵育1h。最后将蛋白膜放置在ECL发光液中,反应2min后,放入化学发光成像系统进

行显色成像。实施例和对比例得到的外泌体的CD9、CD63、ALIX蛋白Western Blot如图14所示,亲和切向流过滤系统提取纯化的外泌体,其CD9、CD63、ALIX蛋白条带清晰明亮,ApoB蛋白几乎没有条带,而超速离心法和超滤法提取的外泌体,其CD9、CD63、ALIX蛋白条带的清晰度较低,且ApoB蛋白有很深的条带,进一步说明超速离心法和超滤法提取的外泌体中含有较多的载脂蛋白污染。

[0082] 本发明提供了用于大体积复杂样本外泌体提取制备的亲合切向流过滤系统及制备方法与应用,该方法可对各种样本来源的外泌体提取纯化,特别适合提取大体积复杂样本的外泌体。亲和切向流过滤系统操作方便,提取效率高,获得的外泌体纯度高,产量多,还能保证其生物学活性及完整性,该系统可实现复杂样本外泌体的批量自动化提取,具有极大的商业价值。

[0083] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例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。

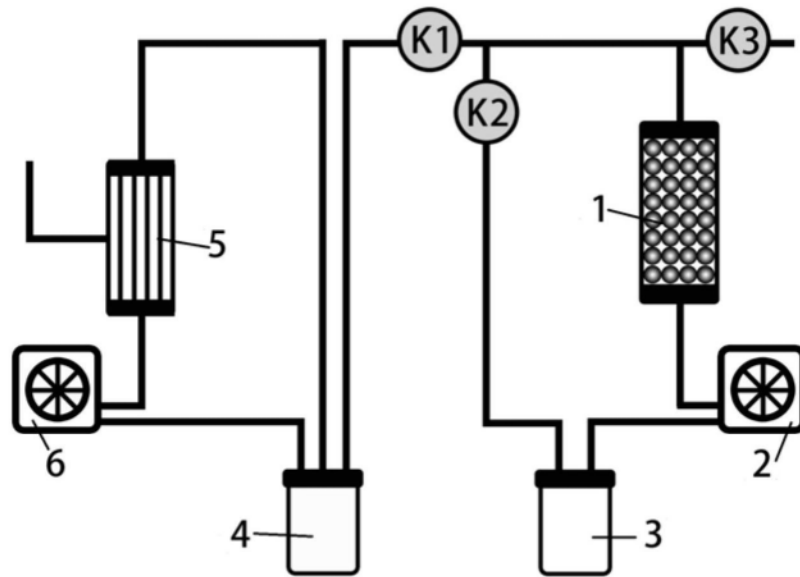


图1

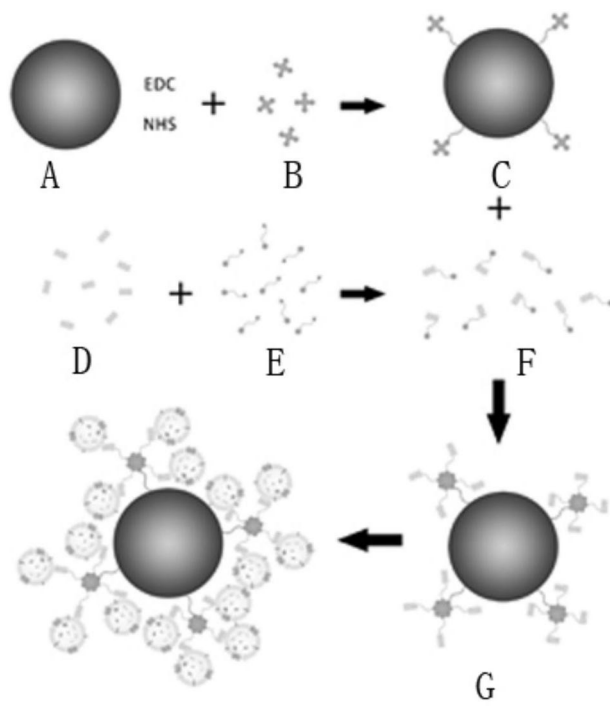


图2

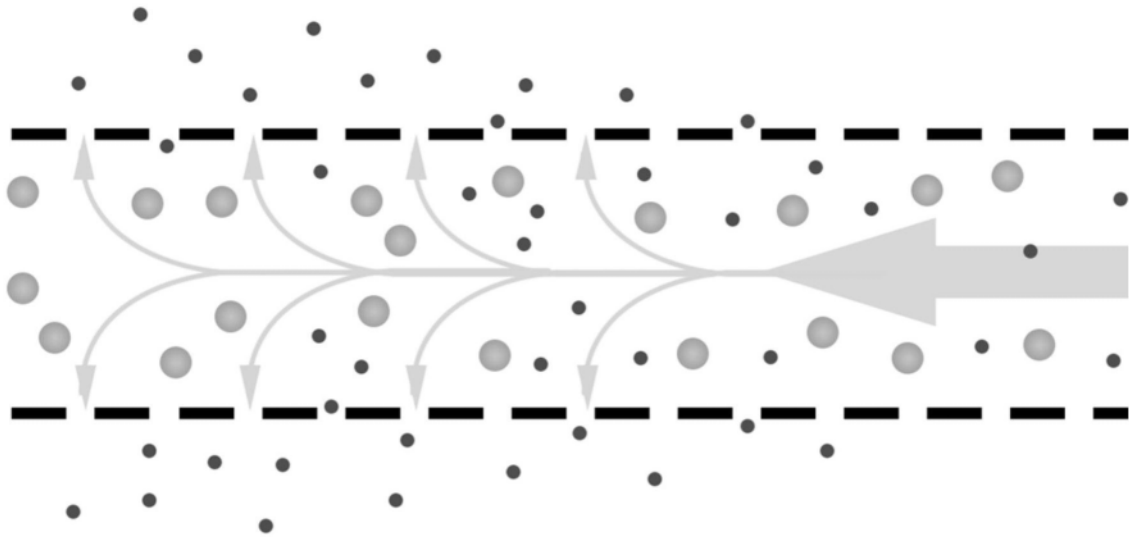


图3

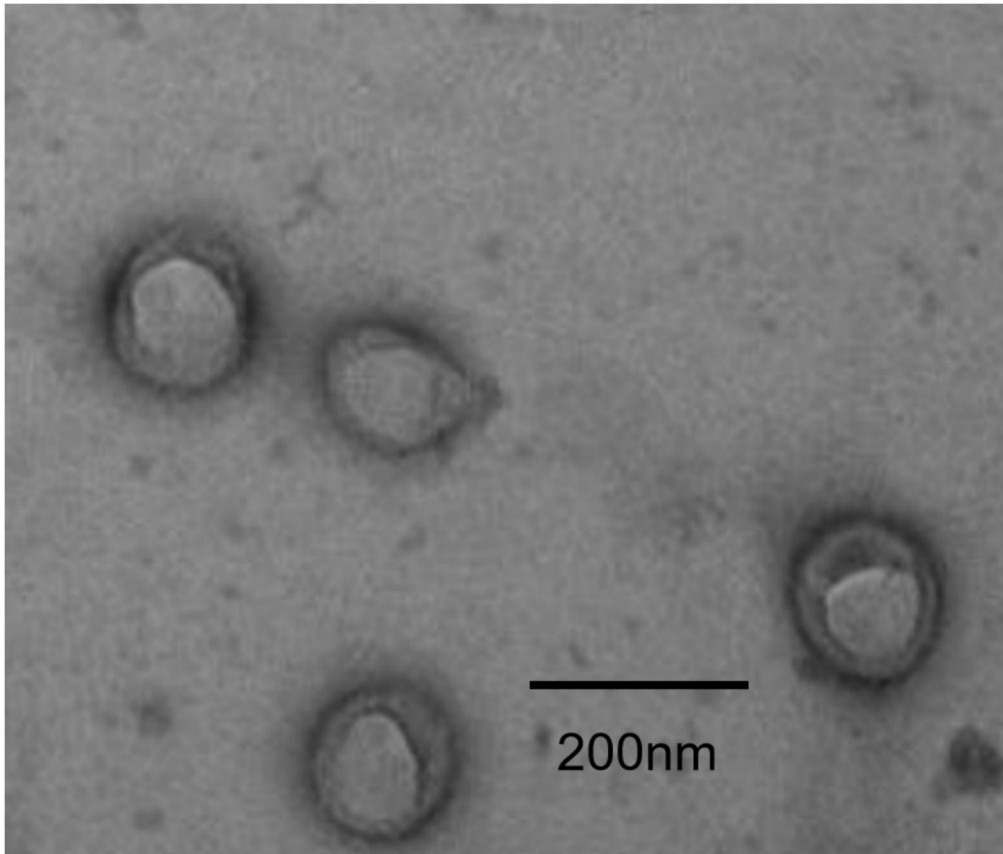


图4

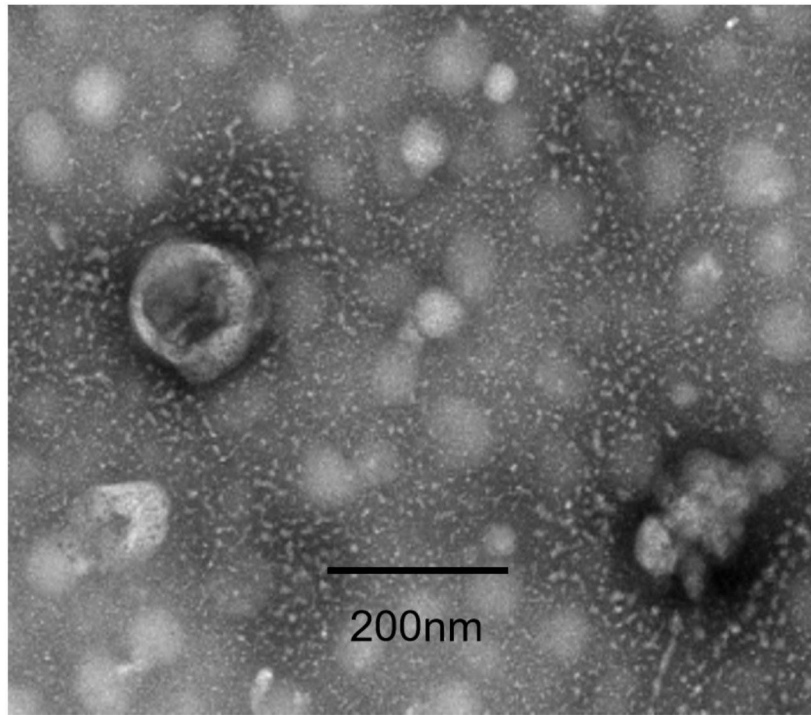


图5

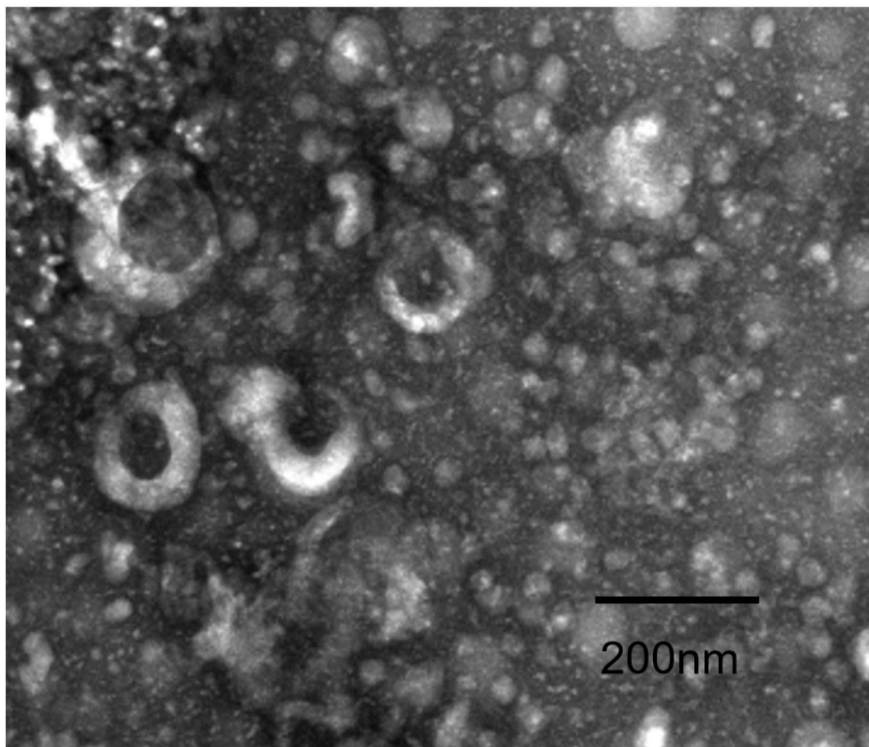


图6

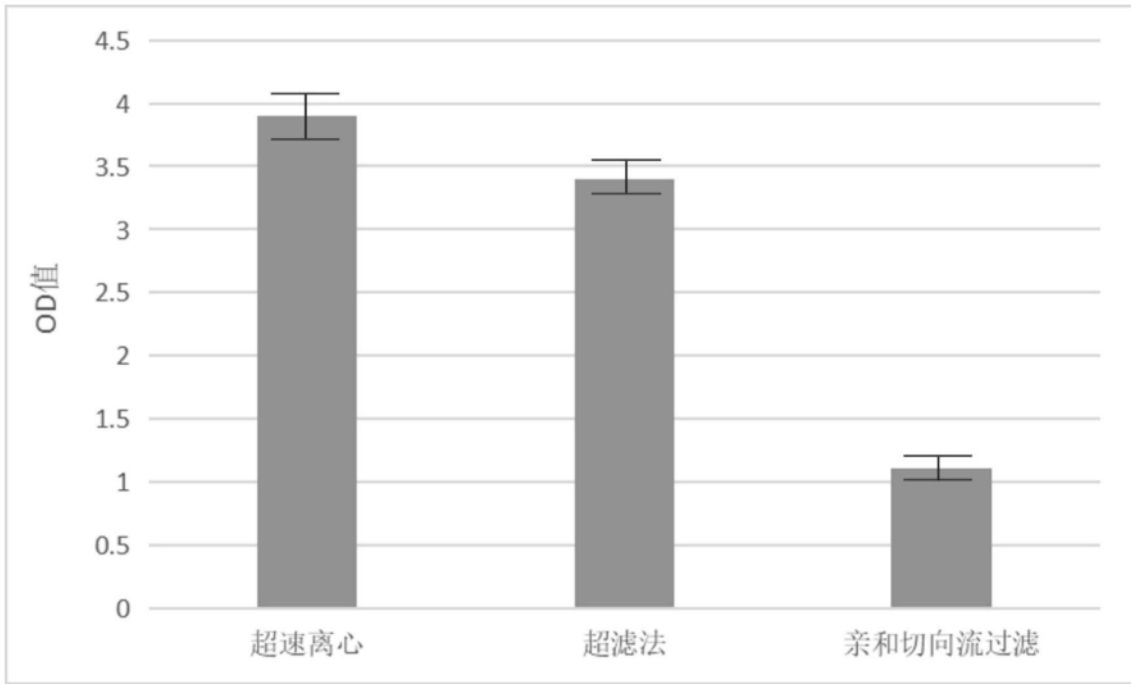


图7

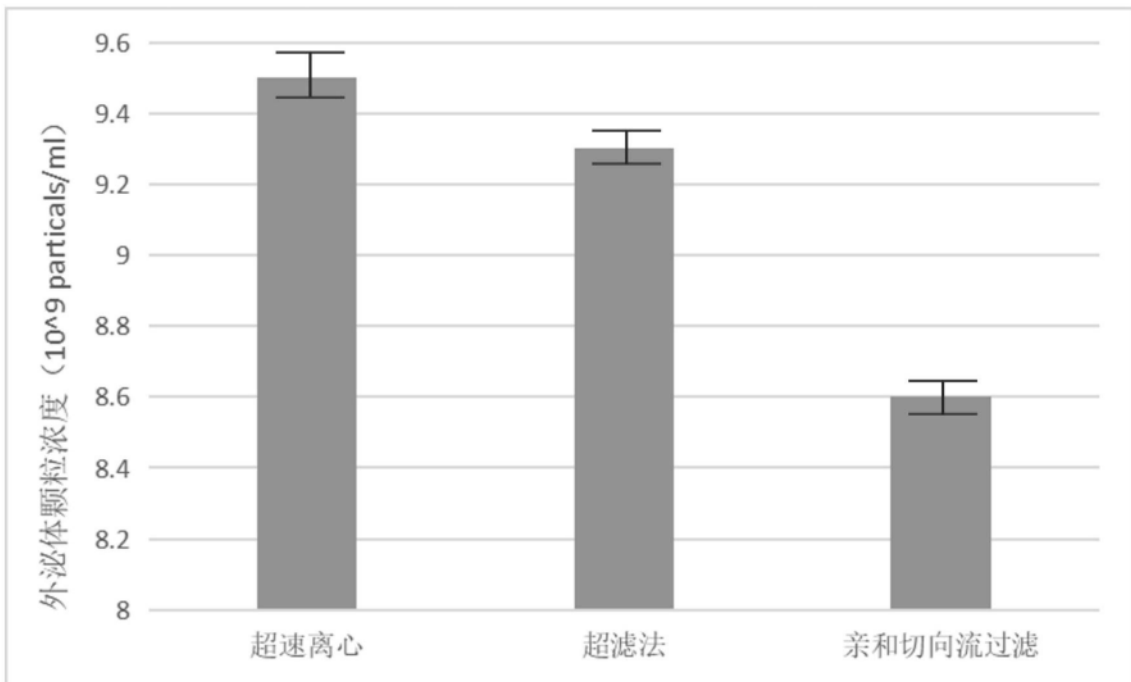


图8

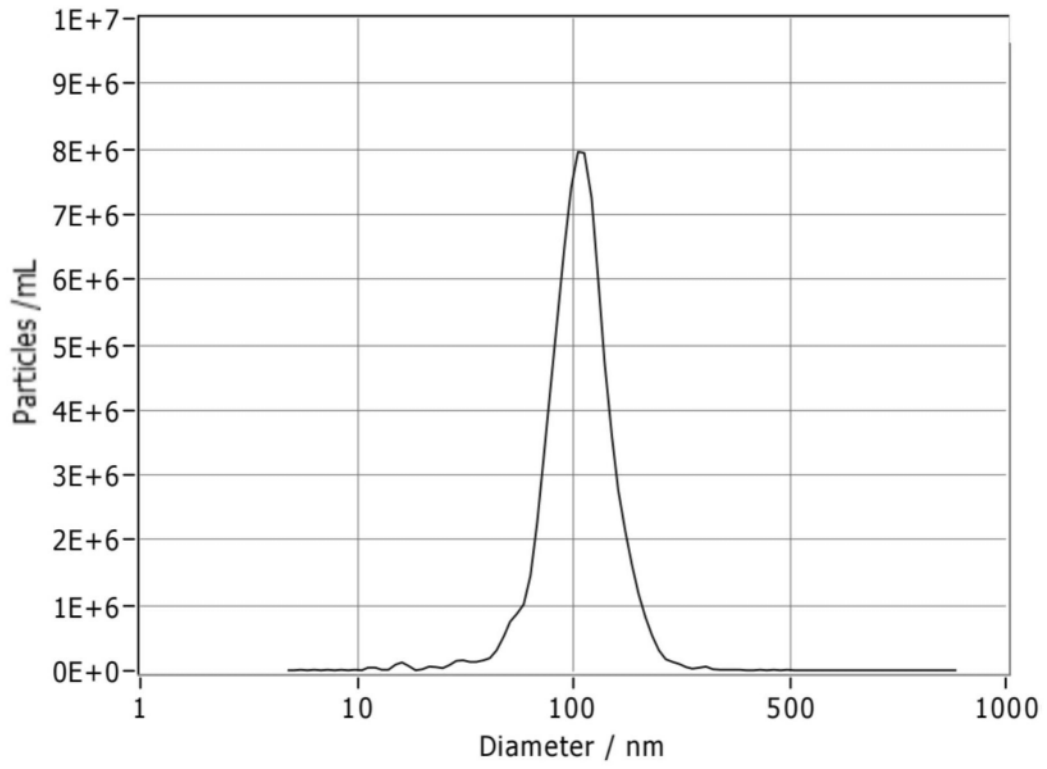


图9

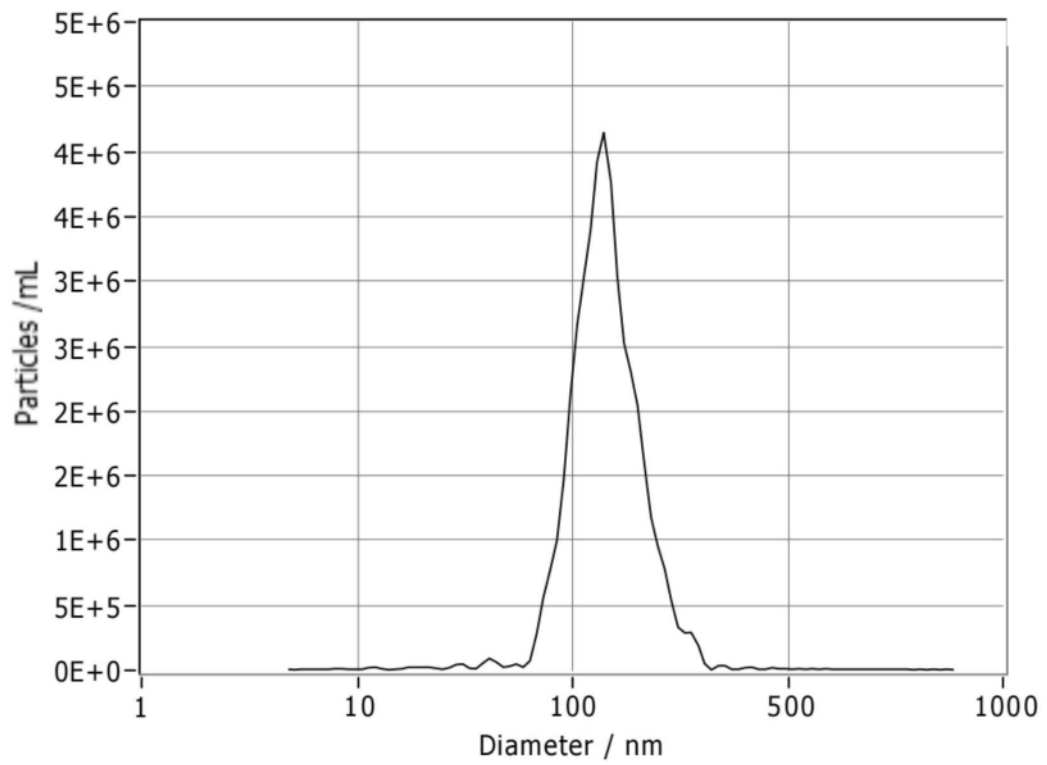


图10

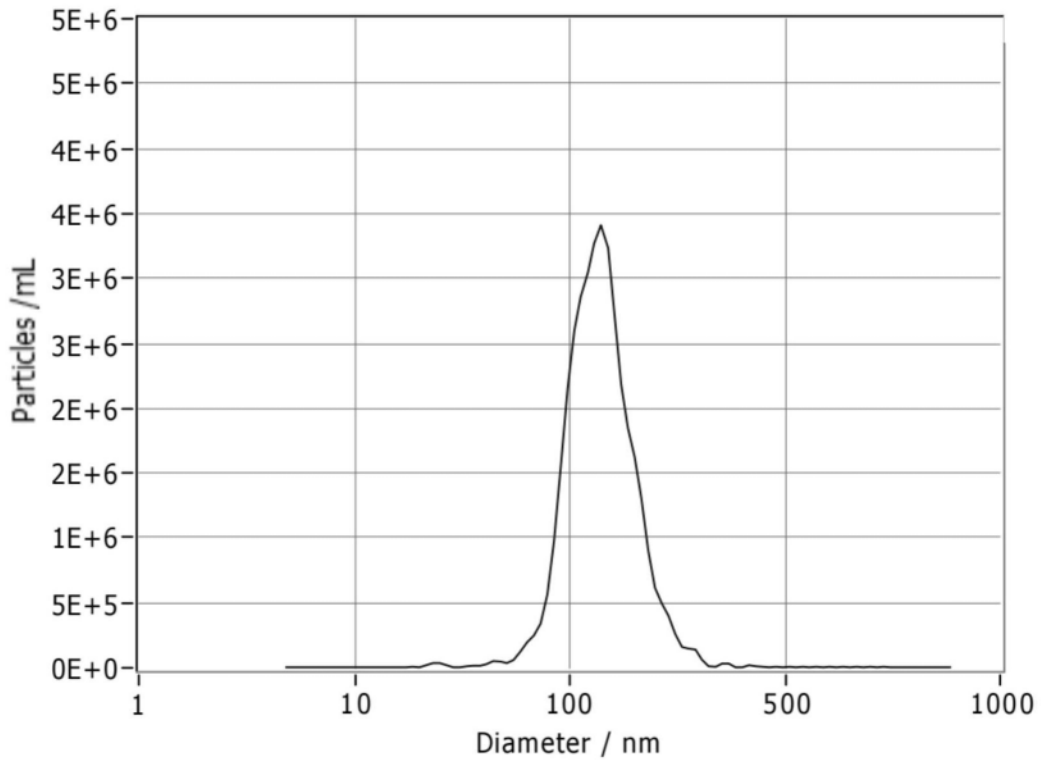


图11

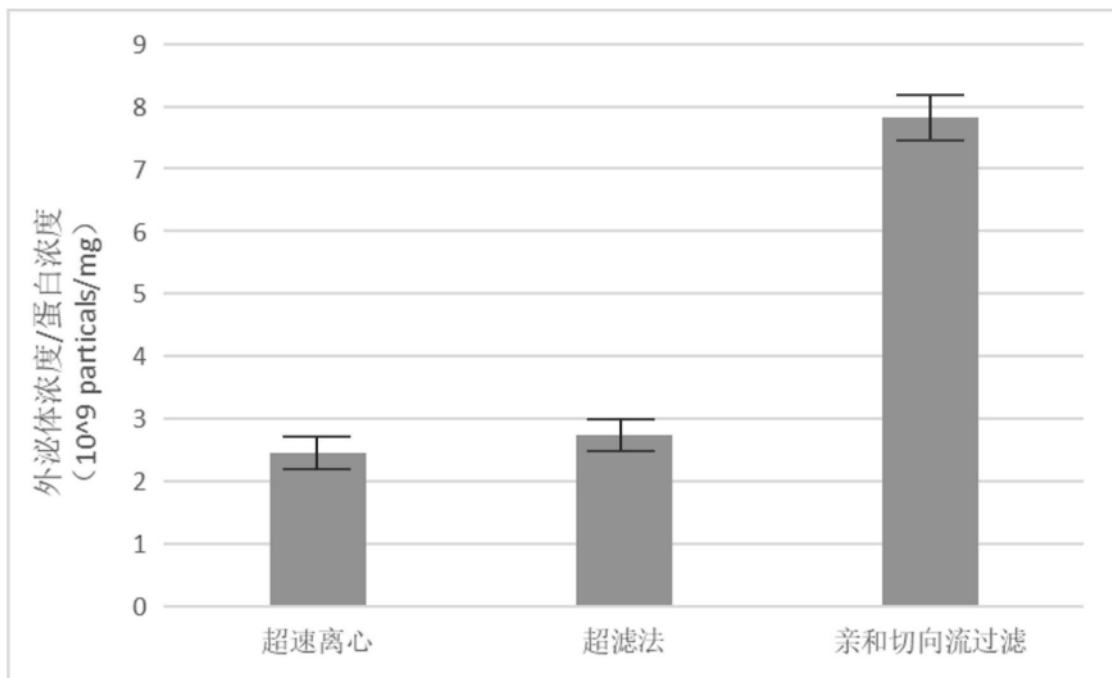


图12



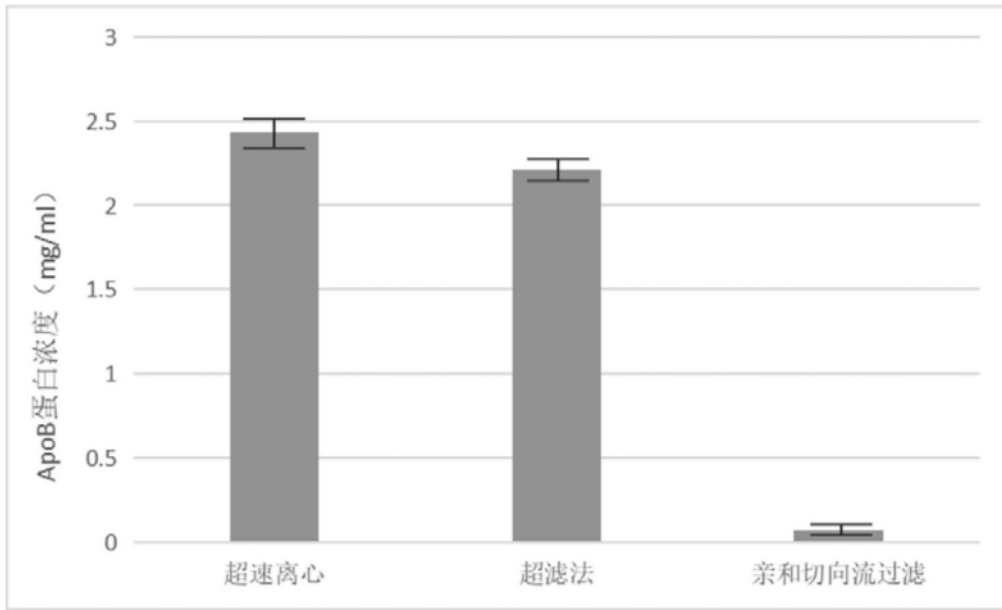


图13

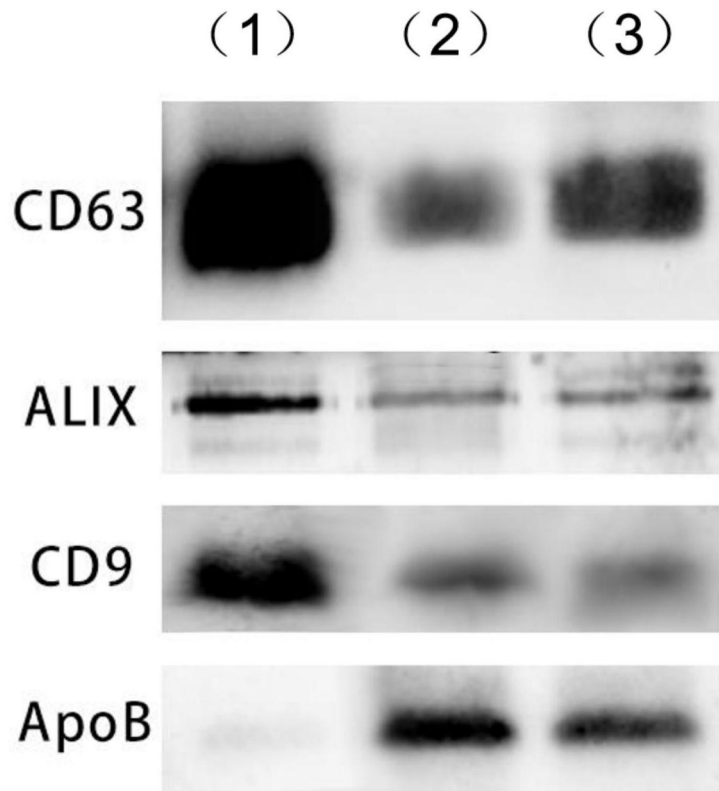


图14