



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109468265 B

(45) 授权公告日 2021.06.22

(21) 申请号 201811316950.X

(22) 申请日 2018.11.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109468265 A

(43) 申请公布日 2019.03.15

(73) 专利权人 广州市创唯曦旺生物科技有限公司

地址 510663 广东省广州市广州高新技术产业开发区科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器A区A804房

专利权人 华南农业大学
广州市科虎生物技术研究开发中心

(72) 发明人 陈婷 张永亮 习欠云 孙加节
史合群 刘燕 吴海雷

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

代理人 颜希文 宋静娜

(51) Int.Cl.
C12N 5/071 (2010.01)

(56) 对比文件

WO 2014161519 A1, 2014.10.09

CN 106544317 A, 2017.03.29

CN 108148809 A, 2018.06.12

CN 101434927 A, 2009.05.20

Bodo C.Melnik 等. MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators.《Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism》.2017,第31卷(第4期),

林德麟 等. 乳中miRNA的研究进展.《畜牧兽医学报》.2016,第47卷(第9期),

审查员 李娟娟

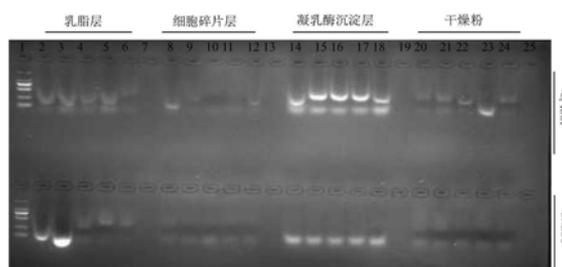
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种提取乳外泌体的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种提取乳外泌体的方法,所述方法包括以下步骤:(1)取乳样,在2000g、4℃、30min离心,收集上清液A;(2)将收集到的上清液A在12000g、4℃、30min离心,收集上清液B;(3)将收集到的上清液B进一步调节pH至5.5-6.0;(4)在36-37℃水浴条件下,将凝乳酶添加于调节pH后的上清液B中,析出乳蛋白沉淀,得到上清液C;(5)将上清液C能够通过0.22 μ M膜的亚组分冷冻干燥成粉,即为乳外泌体。本发明的提取乳外泌体的方法与传统的离心-超高速离心方法相比,该方法减少了超高速离心方法的步骤,节约了提取时所用耗材成本,同时大大加大了样本提取体积。



1. 一种提取乳外泌体的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:
 - (1)取乳样,在2000 g、4℃、30 min离心,收集上清液A;
 - (2)将收集到的上清液A在12000g、4℃、30min离心,收集上清液B;
 - (3)将收集到的上清液B进一步调节pH至5.5-6.0;
 - (4)在36-37℃水浴条件下,将凝乳酶添加于调节pH后的上清液B中,析出乳蛋白沉淀,得到上清液C;凝乳酶的添加量为:酶活力17-18的凝乳酶与上清液B的体积比为1:10;
 - (5)将上清液C分别经1-3 μM、0.45 μM、0.22 μM膜过滤得到亚组分冷冻干燥成粉,即为乳外泌体。
2. 根据权利要求1所述的提取乳外泌体的方法,其特征在于,步骤(1)中所述乳样为牛乳样,所述外泌体为牛乳外泌体。
3. 根据权利要求2所述的提取乳外泌体的方法,其特征在于,步骤(3)中调节pH至5.7。
4. 根据权利要求2所述的提取乳外泌体的方法,其特征在于,述步骤(4)中水浴的温度为36 ℃。
5. 根据权利要求2所述的提取乳外泌体的方法,其特征在于,步骤(1)中所述乳样为新鲜的乳样或者-80℃冷冻保存解冻后的乳样。
6. 根据权利要求2所述的提取乳外泌体的方法,其特征在于,所述步骤(5)中冷冻干燥的条件为:-35℃、-0.22 P。

一种提取乳外泌体的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术方法领域,具体涉及一种提取乳外泌体的方法。

背景技术

[0002] 外泌体 (Exosome) 是一类由内吞作用形成的膜上小囊泡,它通过融合多泡体 (multivesicular bodies, MVB) 而释放到细胞外环境,在透射电镜下呈圆形或杯状磷脂双分子层结构,直径为40~100nm。研究表明,体内外不同的细胞在生理学或病理学状态下都可以分泌外泌体。此外,在动物或体内的各种体液及母乳中也发现有外泌体的存在。而且也已证明exosome内物质与细胞的起源和产生条件密切相关。研究表明,在人、牛及猪的乳汁外泌体中都发现包含mRNA、miRNA而且可以转运进入免疫细胞,潜在地调控免疫细胞功能,进而影响小牛胃肠道和免疫系统发育;同时,牛奶exosome可以掺入分化人的THP-1,利用携带的RNA影响细胞功能;健康妇女分泌的exosome中包含的TGF- β 2可以调整乳腺癌的发育和进程,人乳exosome还可以抵抗消化进而被肠细胞吸收,最终在细胞核的位置发挥作用影响基因表达;人内皮细胞通过细胞内吞作用转移牛乳exosome,证明这种途径是传递饮食exosome给周边组织的一个重要步骤;而人和鼠的小肠细胞系也可以通过细胞和exosome表面糖蛋白依靠内吞作用吸收乳exosome。此外,牛奶exosome还可以携带药物稳定到肿瘤靶标,提高药物效率和安全性。可见,乳exosome的功能越来越被重视,且研究越来越深入,因此,提供一种快速、简单易操作的乳exosome提取方法是科研和功能性乳品开发过程中亟待解决的大事。

[0003] 目前用于exosome分离的方法主要有超高速离心法、蔗糖密度梯度离心法及试剂盒三种方式。通常来源于细胞的exosome超高速离心提取法过程如下:300g,10min,4℃去除细胞;16500g,10min,4℃进一步去除细胞和细胞碎片;收集的上清0.2 μ m过滤以去除大于200nm的颗粒;再将过滤后的上清置于超高速离心机中120000g,70min,4℃即可得exosome。遇到粘性液体时需要在离心和过滤步骤前用PBS稀释样品,并且将去除细胞碎片步骤的离心力增加到29500g,而最终的超高速离心时间增加到90min。不同于以上研究,Laurent Mullera等(2014)报道,将血浆去除细胞后分别经2000g和10000g,4℃离心30min;0.22 μ m过滤,再通过不同分子大小的的层析柱排除大分子蛋白后,105000g,4℃离心2h后将碎片重悬于PBS中再进行连续的蔗糖密度梯度100000g,4℃离心30min离心分离exosome。最终证明此方法能分离到具有生物活性,形态完整的exosome,适当良好的纯化步骤使exosome没有大蛋白污染,可用于免疫学和生物标记及其他方面的研究。也有将蔗糖密度梯度和试剂盒法结合提取exosome,如,血清样品20000g离心45min后,上清转入30%的蔗糖溶液中然后100000g,4℃离心70min。收集到分层后的exosome根据ExoQuick试剂盒要求4℃孵育过夜,然后1500g离心30min去除上清,1500g,5min去除痕量液体,再重悬exosome于PBS中0.02 μ m过滤即可进行标志蛋白、染色及透射电镜检测,结果证明ExoQuick是一种非常有效的分离exosome进行定量研究的方法,而超高速离心法不具备这种功能。报道显示,超高速离心法分离到的血清exosome存在很多白蛋白污染,对血清衍生exosome蛋白质浓度检测造成很大

干扰。有研究采用ExoQuick exosome分离试剂盒从HEK293条件性培养基中成功分离到exosome,并进一步证明在低pH4的条件下细胞可以增加exosome的分泌,推断酸性环境是分离exosome的有利环境。

[0004] 从以上报道可以看出,目前用于实验的都是在超高速离心法、蔗糖密度梯度离心法及试剂盒法三种方法基础上进行优化或组合,以达到提取exosome的目的,并未有其他不同方法出现。由于乳汁中包含大量的乳脂和乳蛋白,不同于其他体液和细胞培养基的exosome,乳汁中exosome分离首先要将乳脂成分去掉。因此,有研究比较了4种乳exosome分离方法的优缺点,结果发现:1) Exo-Quick单独使用不能充分分离牛奶exosome,原因是乳汁中蛋白含量过大,必须经过其他步骤去除;2) 超离心法和Exo-Quick结合法分离法得到的成分复杂,除exosome外还含有他蛋白质或结构;3) 超高速法和密度梯度离心结合法所得exosome大小具有同源性,直径接近50-100nm,且具有光滑的表面;4) 直接分离法,由于牛乳中含有大量的乳脂不能过滤,以致试验无法进行。最终得出结论,应根据下一步的试验要求和目的来选择不同的分离方法进行研究。

[0005] 迄今,针对乳exosome的分离方法报道相对较少。已知的信息显示:1) 试剂盒法,提取样品体积小、价格昂贵,提取成本高;2) 密度梯度离心法操作步骤繁琐、耗时较长、损失较大;3) 超速离心法exosome得率较高,步骤较密度梯度简单,但其纯度很有争议。以上试验方法除试剂盒法不需要超高速离心机,可在普通分子实验室完成提取步骤外,其他两种方式都需要依赖这种相对专一性的仪器,且单次样本提取量都太少;很难达到批量生产或用量较大的试验。因此,寻找一种操作步骤简单、单次样本提取量大、提取成本低廉、省时高效、适用性较广的乳exosome提取方法,显得尤其重要。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术存在的不足之处而提供一种提取乳外泌体的方法。

[0007] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案为:一种提取乳外泌体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0008] (1) 取乳样,在2000g、4℃、30min离心,收集上清液A;

[0009] (2) 将收集到的上清液A在12000g、4℃、30min离心,收集上清液B;

[0010] (3) 将收集到的上清液B进一步调节pH至5.5-6.0;

[0011] (4) 在36-37℃水浴条件下,将凝乳酶添加于调节pH后的上清液B中,析出乳蛋白沉淀,得到上清液C;

[0012] (5) 将上清液C能够通过0.22μm膜的亚组分冷冻干燥成粉,即为乳外泌体。

[0013] 优选地,步骤(1)中所述乳样为牛乳样,所述外泌体为牛乳外泌体。

[0014] 优选地,步骤(3)中调节pH至5.7。

[0015] 优选地,得到所述步骤(5)中的亚组分的方法为:将上清液C分别经1-3μm、0.45μm、0.22μm膜过滤。

[0016] 优选地,所述步骤(2)中冷冻干燥的条件为:-35℃、-0.22P。

[0017] 优选地,述步骤(4)中水浴的温度为36℃。

[0018] 优选地,步骤(4)中,凝乳酶的添加量为:酶活力17-18的凝乳酶与上清液B的体积

比为1:10。

[0019] 优选地,步骤(1)中所述乳样为新鲜的乳样或者-80℃冷冻保存解冻后的乳样。

[0020] 本发明还提上述任意一种所述提取乳外泌体的方法提取得到的牛乳外泌体在抑制RNaseA降解RNA中的应用。

[0021] 本发明的有益效果在于:本发明提供了一种提取乳外泌体的方法及其牛乳外泌体的应用方法。

[0022] (1) 本发明的提取乳外泌体的方法与传统的离心-超高速离心方法相比,该方法减少了超高速离心方法的步骤,节约了提取时所用耗材成本、突破了对大型仪器(超高速离心机)的依赖,同时大大加大了样本提取体积,为大量提取猪乳exosome提供了参考依据;

[0023] (2) 凝乳酶能使乳凝固(主要是酪蛋白凝固),而乳exosome制备过程中干扰最大的蛋白质为酪蛋白,因此,在适当的温度和pH条件控制下,让凝乳酶发挥最大的功效,水解大部分的蛋白质,可降低蛋白质对乳exosome的干扰;

[0024] (3) 通过不同的滤膜(0.45 μ m、0.22 μ m)过滤,可以截留不同分子大小的囊泡,进一步保证了乳exosome的纯度;

[0025] (4) 采用-35℃、-0.22P条件下进行冷冻干燥,可最大限度地保证乳exosome中各功能成分不被破坏,且此法可一次获得大量乳exosome干燥粉末,有利于保存;

[0026] (5) 该方法与蔗糖密度梯度离心法相比,程序简单易操作,且可获得大量乳exosome;与试剂盒法相比,大大节约了提取成本和样本制备量。

附图说明

[0027] 图1为牛乳中存在RNA的图。

[0028] 图2凝乳酶效果测定图。

[0029] 图3为凝乳酶处理牛乳各层中RNA表达(n=5)图。

[0030] 图4为本发明实施例和对比例exosome提取方式RNA表达量(n=6)图。

[0031] 图5为牛乳中存在稳定RNA(n=5)图。

[0032] 图6为牛乳RNA存在于exosome(n=3)图。

[0033] 图7为RNase A对冷冻干燥牛乳exosome中RNA的影响结果图。

具体实施方式

[0034] 为更好的说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合具体实施例对本发明作进一步说明。

[0035] 实施例1

[0036] 作为本发明实施例的一种提取乳外泌体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0037] (1) 将存于-80℃冰箱的牛乳样进行解冻,随后2000g,4℃,30min离心,收集上清液A,沉淀为乳脂蛋白和乳腺细胞碎片(乳脂层);

[0038] (2) 将收集到的上清液A于12000g,4℃,30min离心,收集上清液B,沉淀为乳脂蛋白、酪蛋白及其他细胞碎片(细胞碎片层);

[0039] (3) 将收集到的上清液B进一步调整pH至5.7;

[0040] (4) 在36℃水浴条件下,将凝乳酶添加于调节pH后的上清液B中,凝乳酶的添加量

为:酶活力17-18的凝乳酶与上清液B的体积比为1:10,8-10min析出乳蛋白沉淀(凝乳酶沉淀层),得到上清液C;

[0041] (5) 将上清液C分别经1-3 μ M、0.45 μ M、0.22 μ M过滤,收集滤液于-35 $^{\circ}$ C、-0.22P条件下冷冻干燥成粉,即为牛乳外泌体。

[0042] 对比例1

[0043] 作为本发明对比例的一种提取乳外泌体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0044] (1) 将存于-80 $^{\circ}$ C冰箱的乳样进行解冻,随后2000g,4 $^{\circ}$ C,30min离心,收集上清液A,沉淀为乳脂蛋白和乳腺细胞碎片(乳脂层);

[0045] (2) 将收集到的上清液A于12000g,4 $^{\circ}$ C,30min离心,收集上清液B,沉淀为乳脂蛋白、酪蛋白及其他细胞碎片(细胞碎片层);

[0046] (3) 随后将上清液B在110000g、4 $^{\circ}$ C、2h进行超高速离心后,取上清液冷冻干燥获得牛乳外泌体。

[0047] 实验例1

[0048] 1、酶活性测定

[0049] 采用Arima方法:取100克/升的脱脂乳5毫升在一定温度(35 $^{\circ}$ C)下保温5分钟,加入0.5毫升酶液,迅速混合均匀,准确记录从加入酶液到乳液凝固时间(秒),把40分钟凝结1毫升100克/升的脱脂乳的酶量定义为一个索氏单位(Soxhletunit)(高维东等,2010,徐速,1996)。

[0050] 凝乳酶活力(U) = (2400/T) * (5/0.5) * D

[0051] T—凝固时间

[0052] D—稀释倍数

[0053] 2、乳外泌体RNA抽提

[0054] 采用Trizol一步法抽提外泌体样品中总RNA,具体步骤如下:

[0055] (1) 将实施例1、对比例1所得乳外泌体样品,放入到已加有1mL Trizol试剂的2mL离心管中快速匀浆20s,可根据匀浆程度适当增加匀浆时间;

[0056] (2) 匀浆液转移到1.5mL离心管中,4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心15min,以去除未匀浆完全的组织块;

[0057] (3) 将上清转到另一新的1.5mL离心管中,加入1/5体积0.2mL的氯仿,剧烈摇晃30s使样品充分混匀,室温静置5min,4 $^{\circ}$ C12000rpm离心15min(降速为0);

[0058] (4) 小心转移上层水相至另一新的1.5mL离心管中,加入0.5体积(0.5mL)异丙醇,充分混匀后于-80 $^{\circ}$ C沉淀过夜;

[0059] (5) 12000rpm 4 $^{\circ}$ C离心15min,去上清,加入1mL 75%乙醇,吹打洗涤两次,12000rpm,4 $^{\circ}$ C离心,在超净台内干燥RNA沉淀5~10min,确保酒精完全挥发,加入适量(50 μ L~100 μ L) DEPC处理水于溶解RNA样品;

[0060] (6) 浓度测定:用核酸蛋白测定仪测定总RNA浓度,1 μ L RNA+99 μ L DEPC水,重复测三次,获得RNA浓度和A260/A280、A260/A230值。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量。

[0061] 3、总RNA的中痕量DNA的消化

[0062] 取适量的RNA按表1所列反应体系在PCR管进行消化,37 $^{\circ}$ C消化30min,65 $^{\circ}$ C灭酶5min,用核酸蛋白测定仪测定总RNA浓度,OD260/280、OD260/230,同时取0.5 μ g消化RNA进行

普通琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整度。

[0063] 表1 DNA的消化反应体系

[0064] Table1 Reaction mixture for DNA digestion

成分	加入量 (μL)
Component	Volume (μL)
总 RNA	10~15 (8 μg)
[0065] 10 \times DNase I Buffer	2
DNase I(5U/ μL)	0.5
RNase Inhibitor(40U/ μL)	0.25
DEPC 处理水	补足 20

[0066] 4、乳外泌体中RNA的鉴定

[0067] 取适量的RNA按表2所列反应体系在PCR管进行消化,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化1h,65 $^{\circ}\text{C}$ 灭酶5min。同时取RNase消化后产物进行普通琼脂糖凝胶电泳检测。

[0068] 表2 RNA鉴定反应体系

[0069] Table 2 Reaction mixture for RNA identification

成分	加入量 (μL)
Component	Volume (μL)
总 RNA	10-15 (8 μg)
[0070] 10 \times RNase Buffer	2
RNase (10mg/mL)	0.5
DEPC 处理水	补足 20

[0071] 5、实验结果

[0072] 5.1牛乳中存在RNA

[0073] 将牛乳经超高速离心后,再抽提RNA进行检测后发现其同样包含RNA,且大部分为5s,还有少量28S和18S的存在,经DNase消化后还能清晰可见5S,但所提RNA经RNase A处理后5S条带已消失,如图1所示。由此可见,牛乳经超离步骤后可得到exosome,且牛乳exosome

中存在RNA,大部分为5S,该试验结果与之前乳exosome中RNA成分报道结果相似。

[0074] 5.2凝乳酶索氏单位测定

[0075] 按照凝乳酶测定Arima方法,将0.5mL 2%浓度的凝乳酶添加于配置好的5mL脱脂乳混合液中,当反应时间达到22.5min时,脱脂乳即出现沉淀,出现如图2A、C效果,表现为上清透明层和下层蛋白沉淀。根据凝乳酶活力(U) = (2400/T) * (5/0.5) * D测定公式,计算得出本次所用酶的活力约为17-18个索氏单位,根据所得酶活力,可确定用于后续试验的凝乳酶数量。凝乳酶处理牛乳乳清效果见图2B。

[0076] 5.3牛乳各层中RNA表达

[0077] 根据逐级分离结果,收集不同组分进行RNA抽提结果显示,乳脂层、细胞碎片层、凝乳酶沉淀层及乳清干燥粉层都同时存在RNA,且主要为5S及少量18S,如图3所示,且凝乳酶处理对牛乳中的RNA无明显影响,推测其可用来分离乳中的exosome。但经凝乳酶处理后沉淀层RNA浓度较高,这可能是由于沉淀层所聚集的原始乳成分浓度较高所致,结果见表3,同时可推测乳exosome可能存在于沉淀层和干燥粉层中。

[0078] 5.4不同exosome提取方式得率比较

[0079] 由上述结果可知凝乳酶沉淀层和干燥粉层可能都同时存在exosome,因此将其与超离所得乳exosome中RNA含量进行比较,结果显示,牛乳中超离所得exosome、凝乳酶沉淀层和干燥粉都含有RNA,且含量存在差异,如图4所示,但由于电泳结果无法显示各种方法所得exosome得率,因此,进一步比较了不同方式下所得exosome中RNA含量,并以此来判断exosome得率,结合取样和电泳结果,将最终所得RNA含量换算成原始乳样体积可得超离所得exosome中RNA浓度为0.88ug/mL、凝乳酶沉淀层浓度为0.096ug/mL、干燥层浓度为0.68ug/mL,见表3,可见经超离所得exosome得率为最高,其次为冷冻干燥粉层。

[0080] 表3不同exosome提取方式RNA含量

[0081] Table 3 RNA concentration in different exosome isolated methods

样品 Sample	原始乳样体 积(mL) Raw milk volum	终体积/重 量 Final volum/weig ht	RNA 取样 体积(n=5) Volum for RNA extraction	所得总 RNA 浓度 Total RNA	换算成原始 体积 RNA 浓度 Volum for raw milk
[0082] 超离	30 mL	10mL	1mL	2.64 μg/mL	0.88 μg /mL
凝乳酶	30mL	5mL	1mL	2.88 μg/mL	0.096 μg/mL
沉淀	300mL	12.5g	0.15g	16.53 μg/g	0.68 ug/mL

[0083] 干燥粉

[0084] 5.5 RNase A对牛乳中RNA的影响

[0085] 为证明干燥及超离所得RNA的稳定性,即是否来源于exosome。将新鲜收集到的牛

乳经RNase A处理后再分别进行超离和冷冻干燥处理,两种方式所得样品RNA再与未经处理的超离exosome RNA进行比较,结果显示经RNase A处理后,两种方式所得样品中仍然存在RNA,且与未经RNase A处理的超离样品RNA无区别,如图5所示。可知,牛乳中RNA能抵抗RNase A的损坏,结合前期猪乳exosome分离方法和鉴定结果,推测牛乳中的RNA可能存在于内源性的exosome中,且凝乳酶处理后的冷冻干燥步骤对牛乳中RNA无破坏作用。

[0086] 5.6 RNase A对不同提取方法所得exosome中RNA影响

[0087] 为进一步确定不同提取方式所得RNA存在exosome中,将收集到的新鲜牛乳经冷冻干燥和超离处理后,再经RNase A处理并进行RNA抽提,结果显示,经超离和冷冻干燥不同提取方式所得exosome样品在RNase A处理条件下,都可检测到RNA的存在,对其含有的RNA表达无影响,如图6所示,可见,超离和冷冻干燥法对牛乳中的RNA无影响,其可以稳定表达,确定牛乳中的RNA可通过exosome保护作用不被降解。

[0088] 5.7 RNaseA对冷冻干燥牛乳exosome中RNA的影响

[0089] 同样,比较了RNase A处理前、后对牛乳exosome中RNA的影响,结果显示,在冷冻干燥前有无RNase A存在的情况下,电泳结果显示都有条带,确定对其RNA含量都无影响,如图7所示,由此可进一步证明,牛乳exosome中的RNA可稳定存在,且采用凝乳酶方法处理后,再采用冷冻干燥乳清的方法来提取乳exosome,不影响其内源性RNA的表达,此方法可用来抽提乳中exosome。

[0090] 5.8结论

[0091] (1) 牛奶中的exosome含有RNA,大部分为5S,少量为28S和18S。

[0092] (2) 凝乳酶处理法可成功分离到牛乳exosome,主要位于能够通过0.22 μ m的上清液C的干燥层,少量位于凝乳酶沉淀层中。

[0093] (3) 超离和凝乳酶处理方法提取牛乳exosome得率比较,凝乳酶处理法得率仅次于超离法。

[0094] (4) RNase A处理对超高速离心法和乳清冷冻干燥法所得exosome内RNA表达无影响,即exosome可保护RNA不受降解。

[0095] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

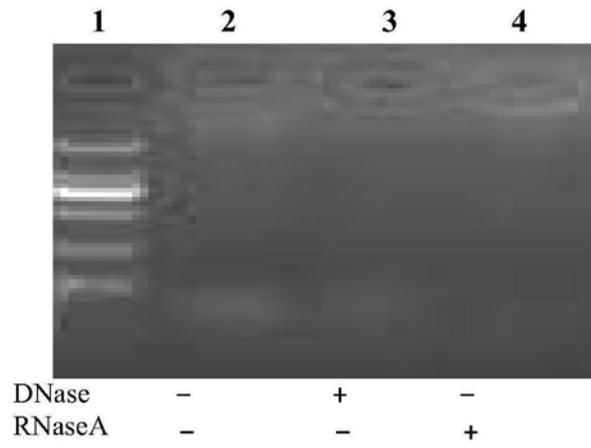


图1

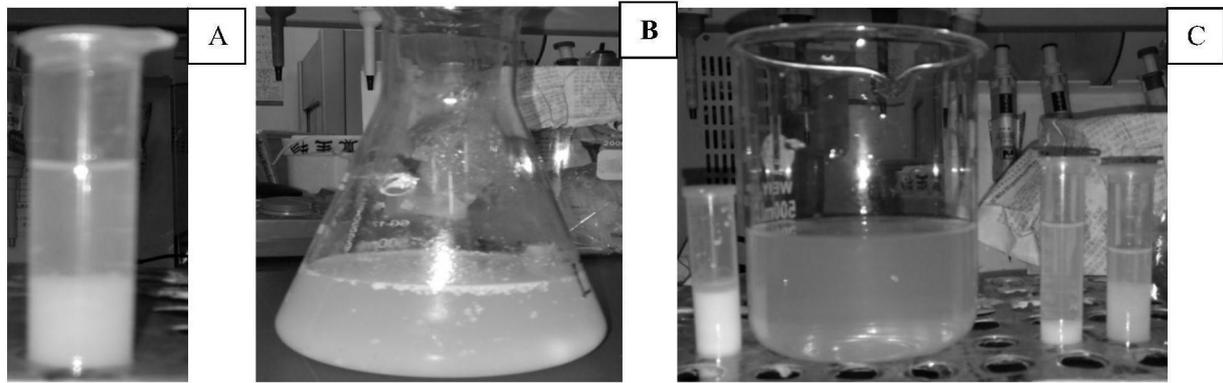


图2

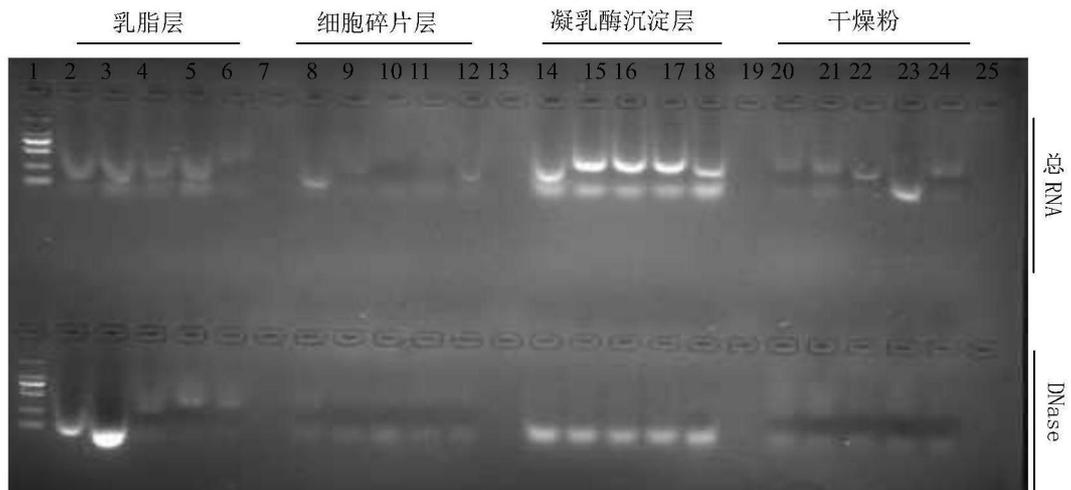


图3

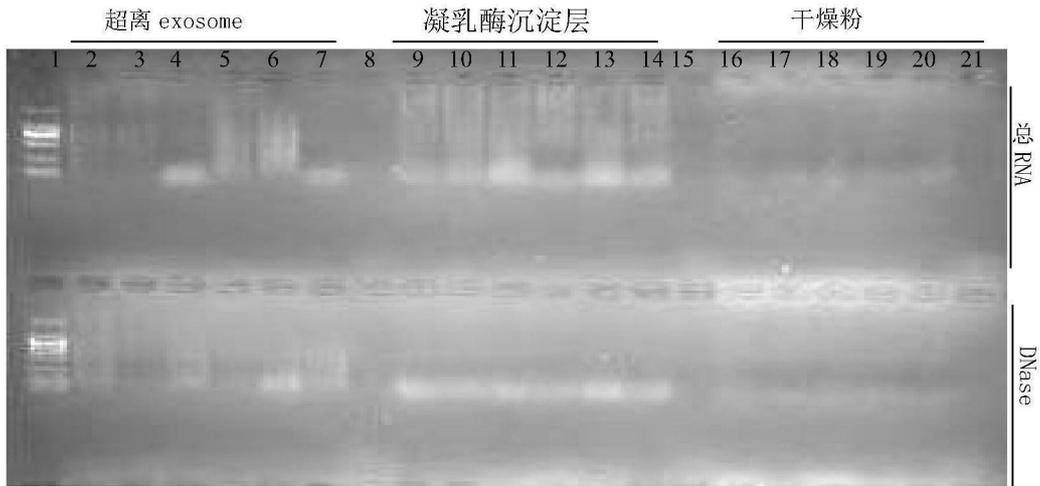


图4

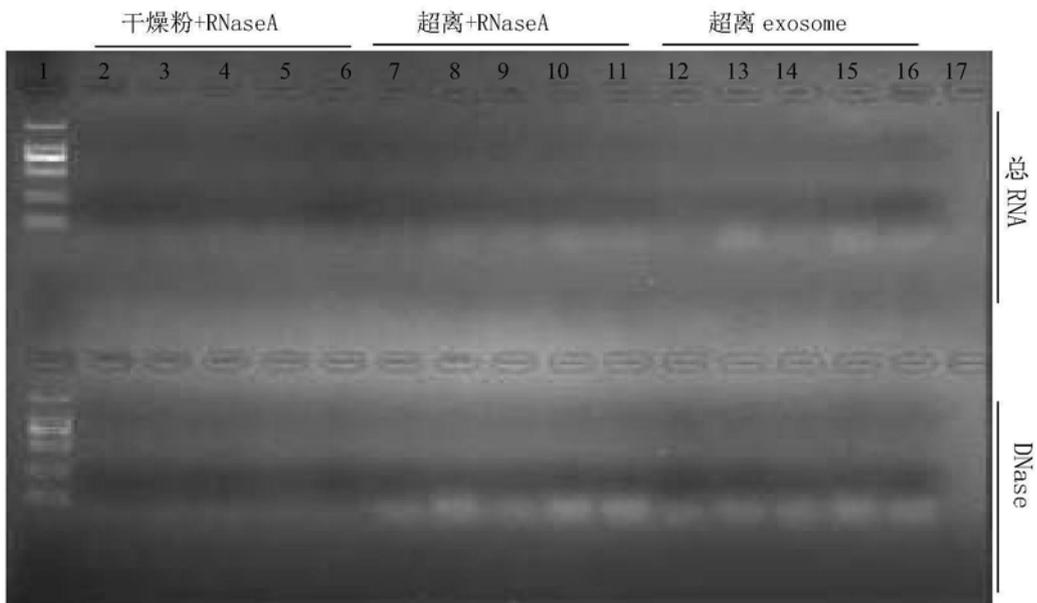


图5

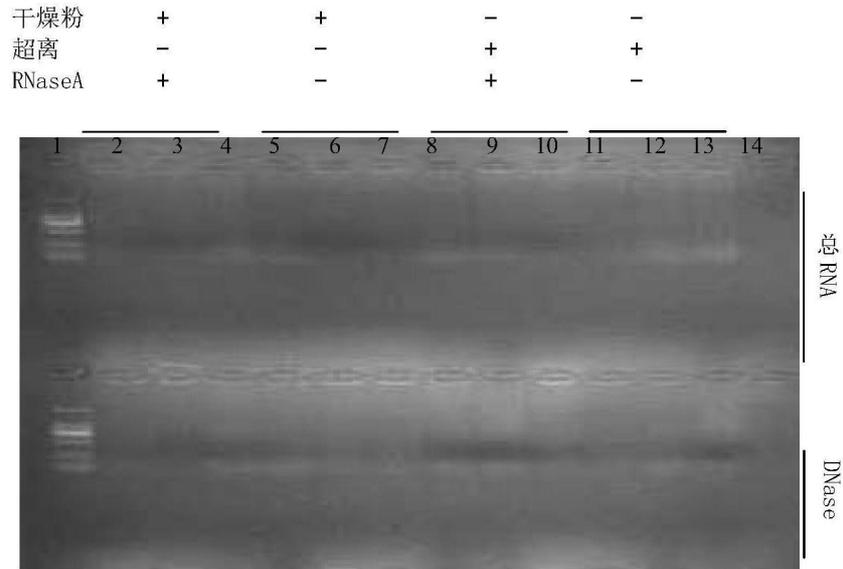


图6

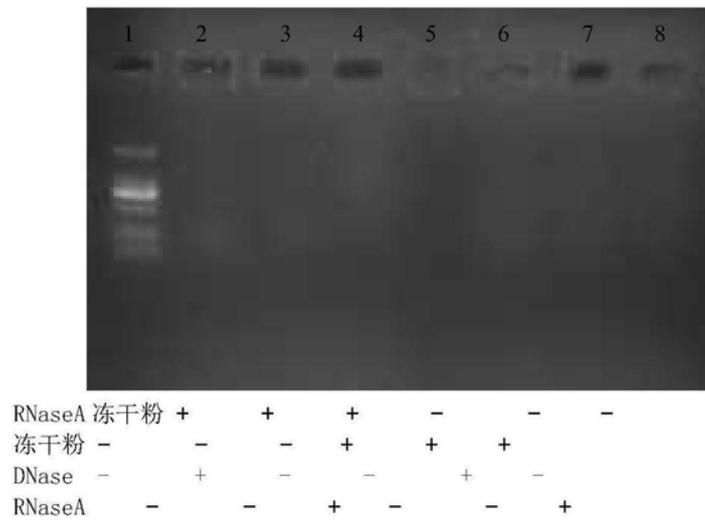


图7