



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108362535 B

(45) 授权公告日 2021.01.15

(21) 申请号 201810107478.2

审查员 顾竹君

(22) 申请日 2018.02.02

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108362535 A

(43) 申请公布日 2018.08.03

(73) 专利权人 北京恩泽康泰生物科技有限公司

地址 102206 北京市昌平区中关村生命科技园生命园路8号院(北大医疗产业园)1号楼106室

(72) 发明人 赵立波 孔关义 杨玉清 谢琪琪

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

11002

代理人 王文君 陈征

(51) Int. Cl.

C12Q 1/24 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图4页

(54) 发明名称

一种基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法,包括向体液样本中加入聚乙二醇和葡聚糖,通过加入缓冲溶液调节体系的pH值为6.4-8.5,充分混合后震荡,形成白色乳浊液;然后离心,溶液分为上下两层;分离得到胞外囊泡。本发明通过优化聚乙二醇/葡聚糖系统的pH值,显著提高ATPS胞外囊泡提取的效率及产物纯度。本发明使用ATPS法进行胞外囊泡提取最大的优势在于操作快捷简便,能够在15-20分钟内回收体液中约60%的胞外囊泡。

1. 一种基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法,其特征在于,包括向体液样本中加入聚乙二醇和葡聚糖,通过加入缓冲溶液调节体系的pH值为 $6.81 \pm 0.3$ 或 $8.07 \pm 0.4$ ,充分混合后震荡,形成白色乳浊液;然后离心,将溶液分为上下两层,弃掉上层聚乙二醇相,将界面附近液体及底部葡聚糖相取出,进一步地加入适量磷酸盐缓冲液;分离得到胞外囊泡;

其中,所述缓冲溶液为pH为6.3-8.5的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液;

所述体系中聚乙二醇和葡聚糖的质量分数分别为6%和1%,或5%和1.5%;

所用聚乙二醇分子量为35,000,所用葡聚糖分子量450,000-650,000;

所述体液样本为人或动物的血浆;

将所述体液样本用磷酸盐缓冲液稀释1-4倍后再提取其中的胞外囊泡。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,调节体系的pH值为6.81或8.07。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 向体液样本中加入聚乙二醇溶液和葡聚糖溶液,通过加入所述缓冲溶液调节体系的pH值为6.81或8.07;

2) 充分混合后剧烈震荡,形成白色乳浊液;

3) 室温下 $1500 \times g$ 离心10分钟后,弃掉上层聚乙二醇相,将界面附近液体及底部葡聚糖相取出,或者,便得到富集后的胞外囊泡。

## 一种基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法。

### 背景技术

[0002] 包括复杂的真核生物、革兰氏阴性和阳性细菌、分歧杆菌和真菌在内的多数生命体都会分泌胞外囊泡 (Extracellular vesicles)。其类型主要包括,外泌体 (Exosome, 粒径50-100nm)、微泡 (Microvesicle, 粒径20-1000nm),以及凋亡小体 (Apoptotic blebs, 粒径1000-5000nm) 等<sup>1,2</sup>。在人体中,内源性胞外囊泡被证实在凝血、细胞间信号传递以及废物管理中发挥作用<sup>3</sup>。与此同时,胞外囊泡因为内含核酸、蛋白质、脂类等多种生物分子,在疾病的诊断和治疗方面均具有很大的潜力<sup>4</sup>。

[0003] 目前用于体液中胞外囊泡提取和分离的方法主要包括,超速离心法、膜亲和捕获法、免疫捕获法、超滤膜法,以及聚合物沉降法等。其中,超速离心法是基于胞外囊泡与体液中其它组分大小和密度的区别,借助超速离心机将其分离出来,该方法所需设备昂贵、操作复杂、且回收率不高<sup>5-7</sup>。膜亲和捕获法和免疫捕获法需要用到修饰有膜亲和分子或者外泌体特异性抗体的固相表面,导致提取成本较高,不适合体系放大<sup>8-11</sup>。超滤膜法是基于胞外囊泡粒径大小的筛选方法,能够实现快速分离,但是无法实现对胞外囊泡的浓缩,而且胞外囊泡可能在微米或者纳米孔径的超滤膜所俘获影响最终的提取效率<sup>12,13</sup>。聚合物沉降法,是利用如聚乙二醇一类的聚合物,通过改变体液中的微环境,降低胞外囊泡的溶解度,从而使其沉降,该方法无需大型设备,但是因为囊泡的沉降过程需要孵育一段时间(0.5小时-过夜不等),完成一次操作所需时间依旧很长<sup>14,15</sup>。

[0004] 双水相系统 (Aqueous Two-Phase System, ATPS) 是一种液-液分离技术,在蛋白质、病毒与核酸等生物分子的分离和纯化中具有广阔的应用前景<sup>16</sup>。该方法不仅具有较高的分离效率,更重要的是能大幅降低操作时间。目前国际上采用ATPS方法来分离胞外囊泡的工作已有报道,主要是使用两种不同的高分子聚合物(聚乙二醇和葡聚糖)在一定浓度下形成的互不相溶的双水相体系,让胞外囊泡在两相间进行再分配,然后配合低速离心让聚合物溶液形成上下两层,胞外囊泡会富集在位于下层的葡聚糖中<sup>17,18</sup>。

[0005] 然而,除聚合物浓度之外,影响ATPS对目标颗粒或生物大分子再分配效率的参数还有包括pH值和温度<sup>16</sup>。尤其以血浆为例,其中最主要的几个蛋白质的含量及其等电点分为:白蛋白55%, pI 4.7~5.3;球蛋白35%, pI 7.5;纤维蛋白原4%, pI 5.5~5.8。而胞外囊泡的等电点不低于8<sup>19</sup>。有报道显示当pH值高于生物分子等电点时,生物分子在再分配过程中会倾向于进入聚乙二醇 (PEG) 相<sup>20</sup>,反之亦然。

### 发明内容

[0006] 本发明目的是提供一种基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法,通过优化聚乙二醇/葡聚糖系统的pH值,显著提高ATPS胞外囊泡提取的效率及产物纯度。

[0007] 本发明研究发现,当ATPS水溶液的pH值介于杂质蛋白和胞外囊泡之间某个数值的时候,胞外囊泡的提取效率和纯度能进一步提高。

[0008] 本发明的原理简述如下:

[0009] 根据改良模型,蛋白质在双水相系统(ATPS)中的再分配系数K(上层溶质浓度/下层溶质浓度),符合以下表达式:

$$[0010] \quad K = K_{\text{hphob}} \cdot K_{\text{el}} \cdot K_{\text{size}} \cdot K_{\text{sol}} \cdot K_{\text{aff}}$$

[0011] 其中 $K_{\text{hphob}}$ , $K_{\text{el}}$ , $K_{\text{size}}$ , $K_{\text{sol}}$ ,和 $K_{\text{aff}}$ 分别代表亲疏水性,静电作用力,粒径,溶解度和亲和力对总分配系数的贡献值<sup>21</sup>。改变pH值能够影响溶质的电性及表面性质,当ATPS的pH值等于蛋白质等电点pI的时候蛋白质净电荷为0,而当pH低于或高于等电点pI时,蛋白质分别带正电或负电。有文献显示,较高的pH值(>pI)会让目标蛋白更倾向于富集在PEG相。本发明方法原理示意图如图1所示。

[0012] 本发明技术方案如下:

[0013] 一种基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法,包括向体液样本中加入聚乙二醇(PEG)和葡聚糖(DEX),通过加入缓冲溶液调节体系的pH值为6.4-8.5,充分混合后震荡,形成白色乳浊液(ATPS);然后离心(一般1500×g离心10分钟),将溶液分为上(聚乙二醇相)下(葡聚糖)两层;因为在两相中的分配系数存在差异,胞外囊泡会主要集中在下层葡聚糖相以及两相界面上;分离得到胞外囊泡。

[0014] 进一步地,所用聚乙二醇(PEG)分子量35,000,葡聚糖(DEX)分子量450,000-650,000。

[0015] 进一步地,通过加入缓冲溶液调节体系的pH值为6.30-7.20或pH值为7.60-9.40。例如可调节体系的pH值为6.30、6.32、6.81、7.18、7.20、7.60、7.64、8.07、9.36、9.40;优选为6.81±0.3或8.07±0.4。

[0016] 进一步地,所述缓冲溶液为碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液,或磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲溶液;优选地,所述缓冲溶液pH为6.3-8.5。

[0017] 由于人血浆的pH值在7.35~7.45左右,因此可采用pH值较低(例如pH值6.3-6.6)的所述缓冲溶液(buffer)调节上述体系的pH至所需范围(例如6.81左右);然后再用与所述体系相同pH的缓冲溶液(buffer,例如6.81左右)去定容体积或确定稀释倍数。研究表明,上述体系或所述缓冲溶液的pH值在适当范围内(例如6.81±0.4或8.07±0.4)是可以接受的。所以可用>2倍样本体积的所述缓冲溶液(例如6.81±0.4或8.07±0.4)去直接稀释样本。

[0018] 进一步地,上述体系中聚乙二醇的质量分数为3-7%,优选为4-6%,更优选为5%。

[0019] 进一步地,上述体系中葡聚糖的质量分数为0.5-2.5%,优选为1-2%,更优选为1.5%。

[0020] 进一步地,所述体系中聚乙二醇与葡聚糖的质量浓度比为(2-6):1;例如2:1、3:1、4:1.5、4:1、5:1.5、5:1、6:1;优选为(4-5):1.5。

[0021] 更进一步地,上述体系中聚乙二醇和葡聚糖的质量分数分别为6%和1%;5%和1%;5%和1.5%;4%和1%;4%和1.5%;4%和2%;更优选为5%和1.5%。

[0022] 进一步地,将聚乙二醇和葡聚糖配置成一定质量浓度的母液,再按需要加入到上

述体系中。例如聚乙二醇和葡聚糖母液的质量浓度分别为30-60%和5-25%。较佳地,是将聚乙二醇和葡聚糖配置成上述体系中所需浓度10倍左右的母液,例如上述体系中若需要聚乙二醇的质量浓度为5%,那么将聚乙二醇配置成质量浓度为50%的母液。这样会有利于实际操作。

[0023] 进一步地,所述体液样本包括人或动物的血浆、血清、尿液、髓脊液、腹水等。

[0024] 进一步地,将所述体液样本用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释1-4倍后再按上述方法提取其中的胞外囊泡。

[0025] 本发明所用原料均可市售购得,或按本领域常规方法制备。

[0026] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可以相互组合,即得本发明各较佳实例。

[0027] 具体地,上述基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法,包括以下步骤:

[0028] 1) 向体液样本中加入聚乙二醇溶液和葡聚糖溶液,通过加入所述缓冲溶液调节体系的pH值为 $6.81 \pm 0.3$ 或 $8.07 \pm 0.4$ ;

[0029] 2) 充分混合后剧烈震荡,形成白色乳浊液(ATPS);

[0030] 3) 室温下 $1500 \times g$ 离心10分钟后,弃掉上层聚乙二醇相,将界面附近液体及底部葡聚糖相取出,或者进一步地加入适量磷酸盐缓冲液(PBS),便得到富集后的胞外囊泡。

[0031] 所述磷酸盐缓冲液(PBS)可按本领域常规方法配制,优选其pH值为7.4。

[0032] 经我们用无胞外囊泡的血浆蛋白以及人血浆提取的胞外囊泡分别实验测定,在不同pH值的条件下,蛋白质和胞外囊泡的分配系数存在显著差异。当pH值为6.81和8.07时,胞外囊泡的再分配系数明显高于其它条件。

[0033] 于此同时,在胞外囊泡回收率没有显著变化的情况下,将血浆稀释至原浓度的1/4能够将产物中杂质蛋白的回收率降低10-15%。胞外囊泡回收率高于两种现有的商用试剂盒(SBI的exoQuick和Qiagen的ExoEasy)。

[0034] 本发明使用ATPS法进行胞外囊泡提取最大的优势在于操作快捷简便,能够在15-20分钟内回收体液中约60%的胞外囊泡。

## 附图说明

[0035] 图1为本发明方法原理示意图。

[0036] 图2为实验例1ATPS相分离曲线。

[0037] 图3为实验例2胞外囊泡的回收效率。

[0038] 图4为实验例3杂质蛋白质回收率。

[0039] 图5表示实验例4中pH值对胞外囊泡提取的影响。

[0040] 图6表示实验例5中与SBI ExoQuick和Qiagen ExoEasy的效果比较。

[0041] 图7表示ATPS方法分离胞外囊泡的Western blot及透射电镜表征结果。

## 具体实施方式

[0042] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购买得到的常规产品。

[0043] 实验例1ATPS相分离曲线

[0044] 一、试剂准备

[0045] 使用聚合物聚乙二醇 (PEG) 分子量35,000,葡聚糖 (DEX) 分子量 450,000-650,000,分别稀释到PBS中配置成浓度35%wt和15%wt的储液。将35%wt 的PEG与PBS混合配置成总体积1mL,PEG浓度依次为2%、4%、6%、8%和10% 的溶液。pH为7.4的PBS缓冲溶液。

[0046] 二、ATPS相变曲线的测定

[0047] 然后逐滴向其中加入15%wt的DEX溶液,直至混合后的溶液出现浑浊,记录 使用的DEX溶液体积,并换算成最终的PEG和DEX浓度,得到相图见图2(横坐标表示DEX浓度,纵坐标表示PEG浓度,ATPS phasegraph表示ATPS相图)。结果表明,当PEG与DEX浓度位于该曲线以上时,溶液能够形成互不相溶的两相,其中上层为PEG相,下层为DEX相。

[0048] 实验例2ATPS聚合物浓度优化

[0049] 一、试剂准备

[0050] 使用聚合物聚乙二醇 (PEG) 分子量35,000,葡聚糖 (DEX) 分子量 450,000-650,000。分别配置浓度为60%、50%和40%的PEG 35,000溶液,以及浓度为10%、15%和20%的DEX 450,000-650,000溶液。细胞膜绿色荧光探针DIO。pH 为7.4的PBS缓冲溶液。

[0051] 二、制备绿色荧光标记的胞外囊泡

[0052] 将商用人血浆解冻后1300g离心15分钟,去除细胞残骸。之后将上清转移到新离心管中,3000g离心15分钟后,取上清与PBS以体积比1:9混合,并于4℃下13000g 离心30分钟。将上清分装到20mL的超离管中(每管2mL血浆),100,000g离心1 小时,弃上清,将20mL超离管管底的沉淀重悬到1mLPBS中,继续100,000g离心 1小时,将沉淀在管底的胞外囊泡重悬到100μL(对应2mL血浆)含有5%DIO染料 的PBS中,室温下孵育2小时。过夜透析,去除剩余的DIO染料。

[0053] 三、制备无胞外囊泡人血浆

[0054] 将商用人血浆解冻后,在160,000g下离心18小时,取上清分装冻存待用。

[0055] 四、ATPS浓度优化

[0056] 将1mL绿色荧光标记的胞外囊泡加入到9mL无囊泡人血浆中,构成标准品A。将800 μL标准品A液与100μL60%PEG和100μL 10%DEX混合配置成6%+1%的工作液(6%、1%分别代表PEG和DEX的浓度)。同理,可配置得到为5%+1%, 5%+1.5%,4%+1%、4%+1.5%、4%+2%的工作液。因为这六个条件均位于PEG/DEX 相变曲线上方,因此均可以形成互不相溶的两相。

[0057] 将配置好的ATPS工作液在振荡器上剧烈震荡,然后在1500g下离心10分钟,可观测到明显分层。弃掉上清,将底部和界面附近的液体取出并加入PBS定容到 800μL。取其200 μL,利用多功能酶标仪进行荧光定量,并与标准品A进行比较,即可得到该条件对胞外囊泡的回收效率。结果见图3。虽然6%+1%较5%+1.5%略高,但是考虑到配置6%PEG所需母液粘度过高,最终选择5%+1.5%作为ATPS工 作液浓度。

[0058] 实验例3血浆稀释倍数对胞外囊泡提取的影响

[0059] 一、试剂准备

[0060] 使用聚合物聚乙二醇 (PEG) 分子量35,000,葡聚糖 (DEX) 分子量 450,000-650,000。分别配置浓度为50%的PEG 35,000溶液,以及浓度为15%的DEX 溶液。pH为7.4的PBS

缓冲溶液。

[0061] 二、制备绿色荧光标记的胞外囊泡

[0062] 同实验例2

[0063] 三、制备无胞外囊泡人血浆

[0064] 同实验例2

[0065] 四、血浆稀释倍数优化

[0066] 将1mL绿色荧光标记的胞外囊泡加入到9mL无囊泡人血浆中,构成标准品A。将标准品A与PBS分别以1:1(标准品B)、1:2(标准品C)和1:3(标准品D)混合稀释,然后将标准品A、B、C和D,各取800 $\mu$ L与100 $\mu$ L 50%的PEG和100 $\mu$ L 15%的DEX混合,震荡,然后1500g离心10分钟,弃掉上清,将底部和界面附近的液体取出并加入PBS定容到800 $\mu$ L(A',B',C',D')。通过多功能酶标仪比较A'/A,B'/B,C'/C和D'/D的荧光强度差异,即可得到胞外囊泡的提取效率。通过BCA检测,可得到A'/A,B'/B,C'/C和D'/D的杂质蛋白质回收率。结果见图4(EVs yield表示胞外囊泡的回收率,Protein yield表示总蛋白回收率(总蛋白不仅包括胞外囊泡内含的蛋白,还包括无囊泡人血浆中血浆来源的杂质蛋白)。结果显示不同稀释倍数的血浆胞外囊泡提取效率没有明显差异,但是稀释后的血浆杂质蛋白含量明显降低。

[0067] 实验例4pH值对胞外囊泡提取的影响

[0068] 一、试剂准备

[0069] 使用聚合物聚乙二醇(PEG)分子量35,000,葡聚糖(DEX)分子量450,000-650,000。分别配置浓度为50%的PEG 35,000溶液,以及浓度为15%的DEX溶液。配置了不同pH值的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液,以及磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲溶液。pH为7.4的PBS缓冲溶液。

[0070] 二、制备绿色荧光标记的胞外囊泡

[0071] 同实验例2

[0072] 三、制备无胞外囊泡人血浆

[0073] 同实验例2

[0074] 四、pH值对胞外囊泡提取的影响

[0075] 将荧光标记的胞外囊泡和不同pH值的缓冲液1:3混合,然后按照8:1:1的体积比例与50%PEG和15%DEX混合,震荡,1500g离心后,用荧光比较下层DEX相与上层PEG相中的浓度差( $K = \text{Con}_{\text{DEX}} / \text{Con}_{\text{PEG}}$ )。

[0076] 将无囊泡人血浆和不同pH值的缓冲液1:3混合,然后按照8:1:1的体积比例与50%PEG和15%DEX混合,震荡,1500g离心后,用BCA法比较下层DEX相与上层PEG相中的浓度差( $K = \text{Con}_{\text{DEX}} / \text{Con}_{\text{PEG}}$ )。结果见图5。

[0077] 可见pH6.81和pH8.07的条件相比其他条件具有明显优势。

[0078] 实验例5与SBI ExoQuick和Qiagen ExoEasy的效果比较

[0079] 一、试剂准备

[0080] 使用聚合物聚乙二醇(PEG)分子量35,000,葡聚糖(DEX)分子量450,000-650,000。分别配置浓度为50%的PEG 35,000溶液,以及浓度为15%的DEX溶液。配置了不同pH值为8.07的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液。pH为7.4的PBS缓冲溶液。SBI ExoQuick试剂盒,以及Qiagen的ExoEasy试剂盒。

[0081] 二、制备绿色荧光标记的胞外囊泡

[0082] 同实验例2

[0083] 三、制备无胞外囊泡人血浆

[0084] 同实验例2

[0085] 四、与其它商用试剂盒的比较

[0086] 将1mL绿色荧光标记的胞外囊泡加入到9mL无囊泡人血浆中,构成标准品A。取250  $\mu$ LA与pH 8.07的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液以1:3混合,然后按照8:1:1的比例与50%PEG和15%DEX混合,震荡,1500g离心。取250 $\mu$ LA按照SBI的标准提取流程操作。取250 $\mu$ LA按照Qiagen的标准提取流程操作。结果见图6。ATPS法和ExoQuick的囊泡提取效率通过比较产物和标准品A的荧光强度决定,ExoEasy的囊泡提取效率通过比较溢出液和标准品A的荧光强度决定。

[0087] 图7为用ATPS法分离得到的胞外囊泡的Western blot结果(图7A)及透射电镜结果(图7B)。其中,TSG 101和CD63是外泌体(胞外囊泡中较难分离的一种)特异性蛋白,二者阳性表明ATPS能够分离到胞外囊泡。Calnexin是阴性对照蛋白。

[0088] 实施例1

[0089] 试剂准备:

[0090] 使用聚合物聚乙二醇(PEG)分子量35,000,葡聚糖(DEX)分子量450,000-650,000。分别配置浓度为50%的PEG 35,000溶液,以及浓度为15%的DEX溶液。配置不同pH值的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液,以及磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲溶液;配制pH为7.4的PBS缓冲溶液。人或动物血浆3000xg下离心15分钟后保留上清待用(去除细胞及细胞残骸)。

[0091] 一种基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法,包括以下步骤:

[0092] 1)向血浆中加入聚乙二醇溶液和葡聚糖溶液,通过加入所述缓冲溶液调节体系的pH值为6.81;体系中聚乙二醇和葡聚糖的质量分数分别为5%和1.5%;

[0093] 2)充分混合后剧烈震荡,形成白色乳浊液(ATPS);

[0094] 3)室温下1500 $\times$ g离心10分钟后,弃掉上层聚乙二醇相,将界面附近液体及底部葡聚糖相取出,或者进一步地加入适量磷酸盐缓冲液(PBS),便得到富集后的胞外囊泡。

[0095] 实施例2

[0096] 一种基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法,与实施例1的区别仅在于:通过加入所述缓冲溶液调节体系的pH值为8.07。

[0097] 实施例3

[0098] 一种基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法,与实施例1的区别仅在于:体液样本为血清。

[0099] 实施例4

[0100] 一种基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法,与实施例2的区别仅在于:体液样本为血清。

[0101] 实施例5

[0102] 试剂准备:

[0103] 使用聚合物聚乙二醇(PEG)分子量35,000,葡聚糖(DEX)分子量450,000-650,000。分别配置浓度为50%的PEG 35,000溶液,以及浓度为15%的DEX溶液。配置10%的

NaOH溶液;配制pH为7.4的PBS缓冲溶液。采集人或动物尿液,2000xg下离心20分钟,保留上清(去除尿液中的细胞)。

[0104] 一种基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法,包括以下步骤:

[0105] 1) 向血浆中逐滴加入NaOH溶液,直至尿液pH值为6.81;

[0106] 2) 向体系中加入聚乙二醇和葡聚糖,使二者质量分数分别达到5%和1.5%;

[0107] 3) 充分混合后剧烈震荡,形成白色乳浊液(ATPS);

[0108] 4) 室温下1500×g离心10分钟后,弃掉上层聚乙二醇相,将界面附近液体及底部葡聚糖相取出,或者进一步地加入适量磷酸盐缓冲液(PBS),便得到富集后的胞外囊泡。

[0109] 实施例6

[0110] 一种基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法,与实施例1的区别仅在于:通过加入NaOH调节体系的pH值为8.07。

[0111] 实施例7

[0112] 试剂准备:

[0113] 使用聚合物聚乙二醇(PEG)分子量35,000,葡聚糖(DEX)分子量450,000-650,000。分别配置浓度为50%的PEG 35,000溶液,以及浓度为15%的DEX溶液。配置10%NaOH溶液。采集人或动物腹水,300xg下离心20分钟将上清转移到新的离心管800xg下离心30分钟,然后用0.45μm滤膜过滤。

[0114] 一种基于双水相系统提取体液中胞外囊泡的方法,包括以下步骤:

[0115] 1) 向腹水中逐滴加入NaOH溶液,直至pH值为8.07;

[0116] 2) 向体系中加入聚乙二醇和葡聚糖,使二者质量分数分别达到5%和1.5%;

[0117] 3) 充分混合后剧烈震荡,形成白色乳浊液(ATPS);

[0118] 4) 室温下1500×g离心10分钟后,弃掉上层聚乙二醇相,将界面附近液体及底部葡聚糖相取出,或者进一步地加入适量磷酸盐缓冲液(PBS),便得到富集后的胞外囊泡。

[0119] 【参考文献】

[0120] (1) S, E. L. A.; Mager, I.; Breakefield, X. O.; Wood, M. J. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery* 2013, 12, 347-357.

[0121] (2) Raposo, G.; Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology* 2013, 200, 373-383.

[0122] (3) van der Pol, E.; Boing, A. N.; Harrison, P.; Sturk, A.; Nieuwland, R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological reviews* 2012, 64, 676-705.

[0123] (4) Thery, C. Cancer: Diagnosis by extracellular vesicles. *Nature* 2015, 523, 161-162.

[0124] (5) Momen-Heravi, F.; Balaj, L.; Alian, S.; Trachtenberg, A. J.; Hochberg, F. H.; Skog, J.; Kuo, W. P. Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles. *Frontiers in physiology* 2012, 3, 162.

[0125] (6) Livshits, M. A.; Khomyakova, E.; Evtushenko, E. G.; Lazarev, V. N.; Kulemin, N. A.; Semina, S. E.; Generozov, E. V.; Govorun, V. M. Isolation of exosomes by

differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific reports* 2015,5,17319.

[0126] (7) Lamparski, H.G.; Metha-Damani, A.; Yao, J.Y.; Patel, S.; Hsu, D.H.; Ruegg, C.; Le Pecq, J. B. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *Journal of immunological methods* 2002,270,211-226.

[0127] (8) Balaj, L.; Atai, N.A.; Chen, W.; Mu, D.; Tannous, B.A.; Breakefield, X.O.; Skog, J.; Maguire, C.A. Heparin affinity purification of extracellular vesicles. *Scientific reports* 2015,5, 10266.

[0128] (9) Nakai, W.; Yoshida, T.; Diez, D.; Miyatake, Y.; Nishibu, T.; Imawaka, N.; Naruse, K.; Sadamura, Y.; Hanayama, R. A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. *Scientific reports* 2016, 6,33935.

[0129] (10) Taylor, D.D.; Gercel-Taylor, C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 2008,110,13-21.

[0130] (11) Mathivanan, S.; Lim, J.W.; Tauro, B.J.; Ji, H.; Moritz, R.L.; Simpson, R.J. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 2010, 9,197-208.

[0131] (12) Momen-Heravi, F.; Balaj, L.; Alian, S.; Mantel, P.Y.; Halleck, A.E.; Trachtenberg, A.J.; Soria, C.E.; Oquin, S.; Bonebreak, C.M.; Saracoglu, E.; Skog, J.; Kuo, W.P. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biological chemistry* 2013,394,1253-1262.

[0132] (13) Liang, L.G.; Kong, M.Q.; Zhou, S.; Sheng, Y.F.; Wang, P.; Yu, T.; Inci, F.; Kuo, W.P.; Li, L.J.; Demirci, U.; Wang, S. An integrated double-filtration microfluidic device for isolation, enrichment and quantification of urinary extracellular vesicles for detection of bladder cancer. *Scientific reports* 2017,7,46224.

[0133] (14) Taylor, D.D.; Zacharias, W.; Gercel-Taylor, C. Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling. *Methods in molecular biology* 2011,728, 235-246.

[0134] (15) Yamada, T.; Inoshima, Y.; Matsuda, T.; Ishiguro, N. Comparison of methods for isolating exosomes from bovine milk. *The Journal of veterinary medical science* 2012,74,1523-1525.

[0135] (16) Iqbal, M.; Tao, Y.; Xie, S.; Zhu, Y.; Chen, D.; Wang, X.; Huang, L.; Peng, D.; Sattar, A.; Shabbir, M.A.; Hussain, H.I.; Ahmed, S.; Yuan, Z. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological procedures online* 2016,18,18.

[0136] (17) Kim, J.; Shin, H.; Kim, J.; Kim, J.; Park, J. Isolation of High-Purity Extracellular Vesicles by Extracting Proteins Using Aqueous Two-Phase System. PloS one 2015, 10, e0129760.

[0137] (18) Shin, H.; Han, C.; Labuz, J. M.; Kim, J.; Kim, J.; Cho, S.; Gho, Y. S.; Takayama, S.; Park, J. High-yield isolation of extracellular vesicles using aqueous two-phase system. Scientific reports 2015, 5, 13103.

[0138] (19) Graner, M. W.; Alzate, O.; Dechkovskaia, A. M.; Keene, J. D.; Sampson, J. H.; Mitchell, D. A.; Bigner, D. D. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2009, 23, 1541-1557.

[0139] (20) Andrews, B. A.; Schmidt, A. S.; Asenjo, J. A. Correlation for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of surface hydrophobicity and charge. Biotechnology and bioengineering 2005, 90, 380-390.

[0140] (21) Kula, M. R. Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. Bioseparation 1990, 1, 181-189.

[0141] 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畴。

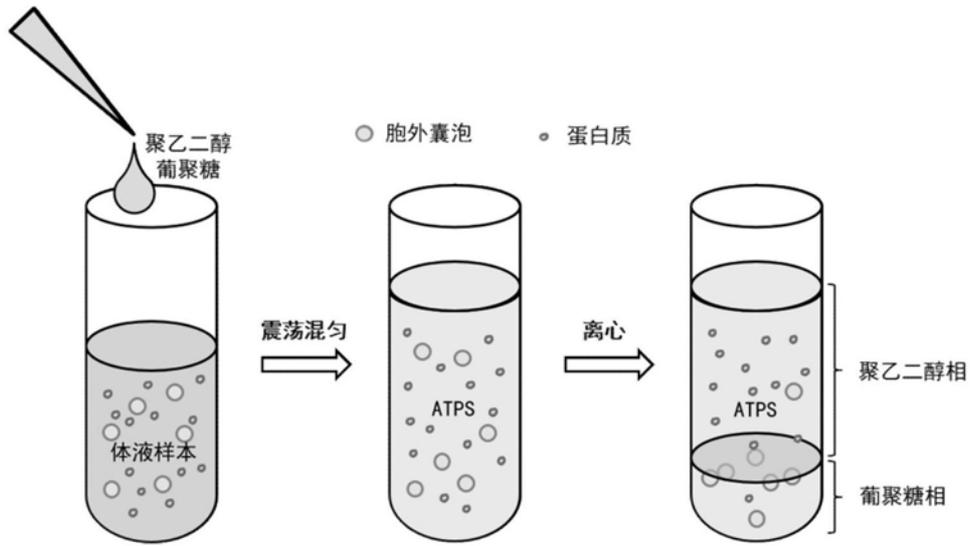


图1

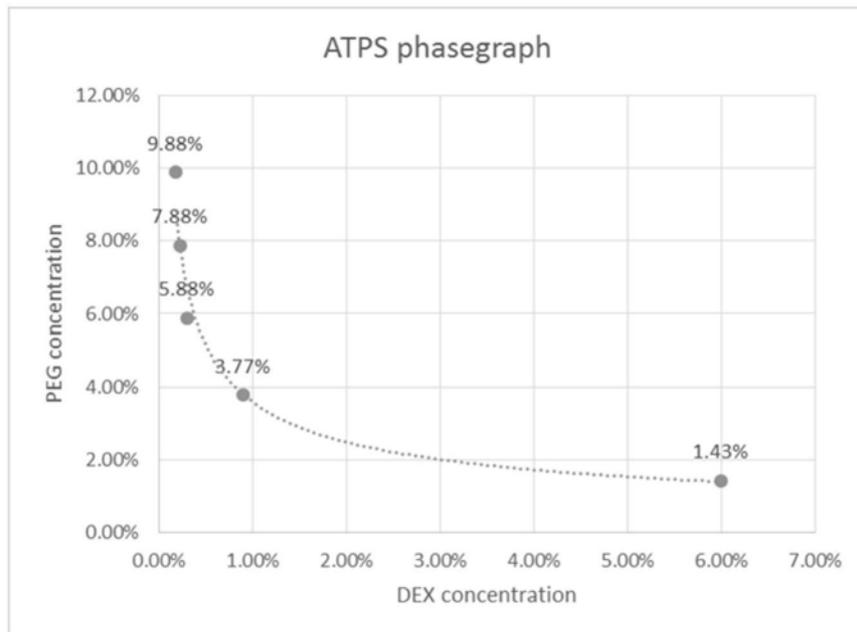


图2

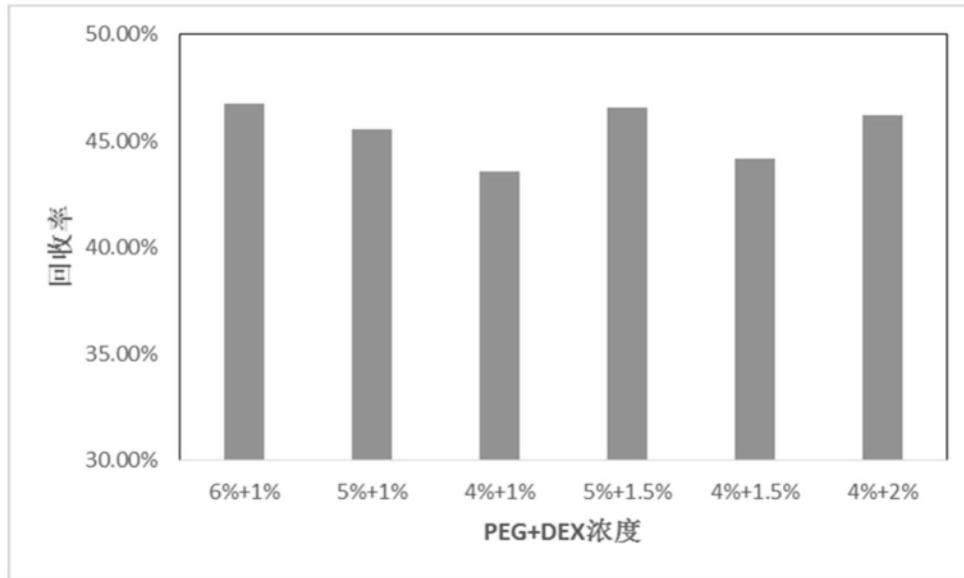


图3

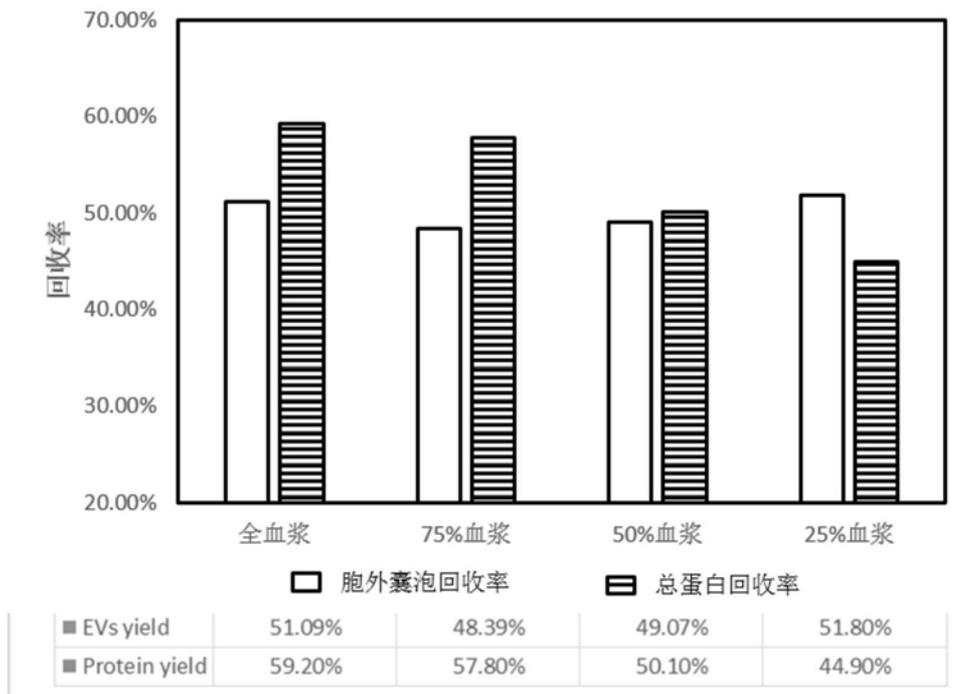


图4

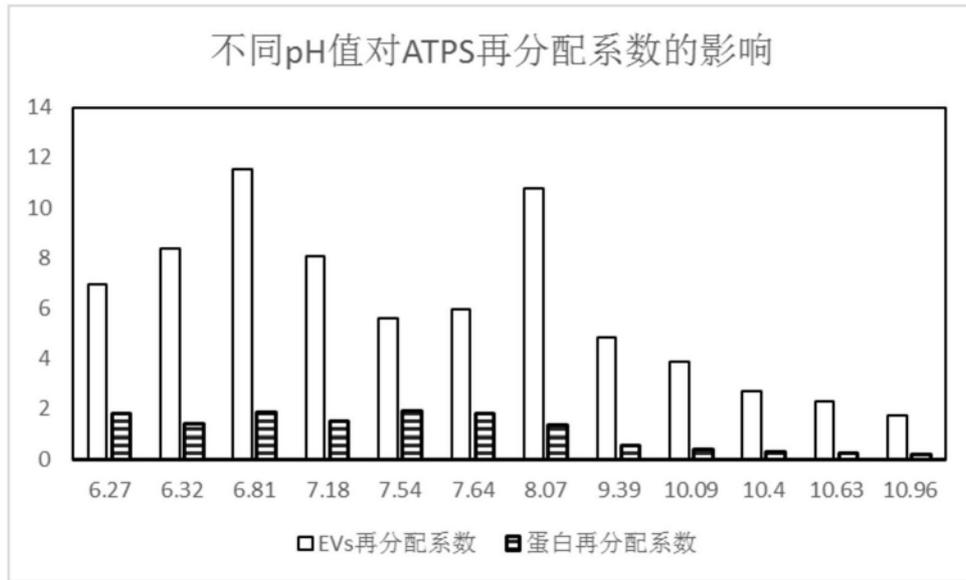


图5

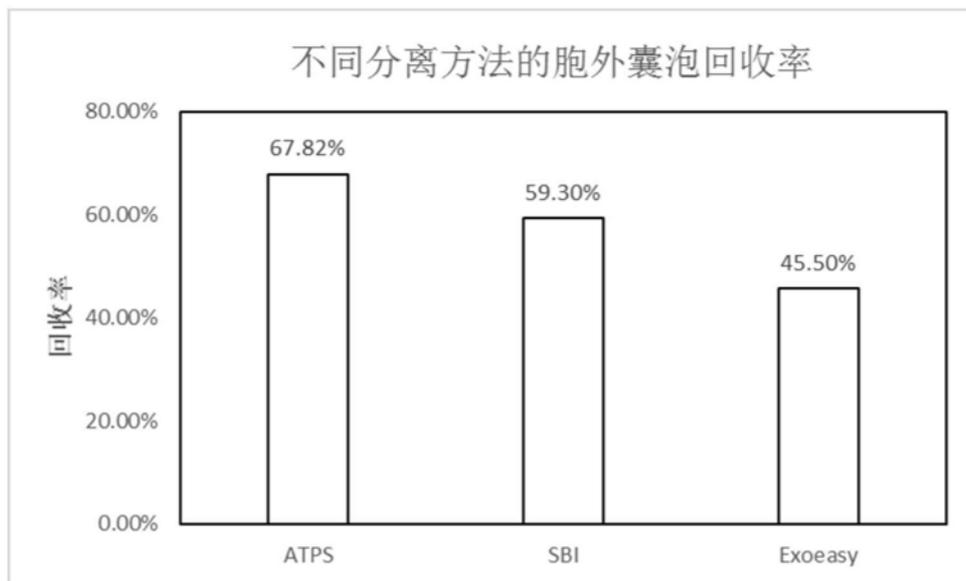


图6

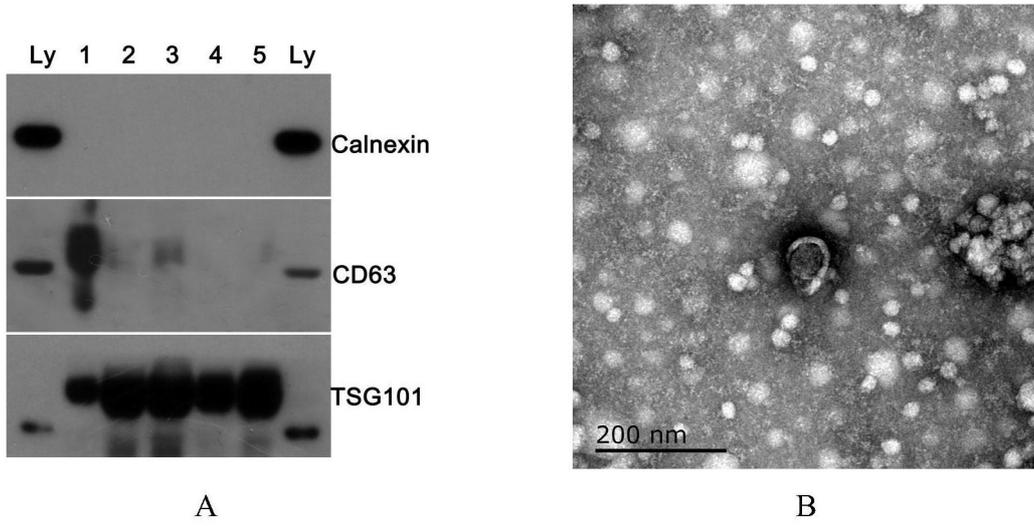


图7