



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111394307 A

(43)申请公布日 2020.07.10

(21)申请号 202010095411.9

(22)申请日 2020.02.17

(71)申请人 天津医科大学眼科医院

地址 300384 天津市滨海新区天津滨海高
新技术产业开发区华苑产业区榕苑路
1号

(72)发明人 李筱荣 张晓敏 张慧

(74)专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限
公司 12209

代理人 韩晓梅

(51)Int.Cl.

C12N 5/078(2010.01)

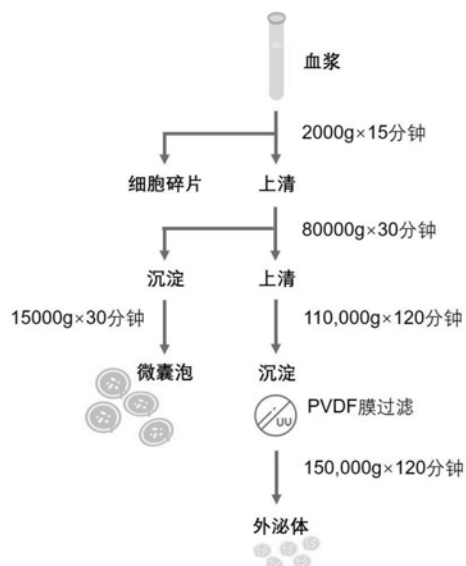
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种分离提纯来自血浆的外泌体的方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种分离提纯来自血浆的外泌体的方法,步骤如下:取人血浆离心后取上清;将离心后的血浆超速离心;离心后抽取上清;将上清离心、倾倒上清后倒置;待管内无可见液滴后,使用滤纸在管内壁进行擦拭;使用PBS反复吹打管底、重悬后注入PBS,混匀;过滤上述重悬液;使用PBS将过滤后的重悬液体积补充后加入超速离心管;离心、倾倒、倒置;待管内无可见液滴后,使用滤纸在管内壁进行擦拭;加入PBS或裂解液重悬管底的沉淀,得到外泌体。本发明方法结合了超速离心以及滤膜过滤的方法,操作简单,可以从较小量的血浆中提取外泌体,所提取的外泌体含量较多,可以用于一系列生物学实验。



1. 一种分离提纯来自血浆的外泌体的方法,其特征在于:步骤如下:

- (1)取人血浆,经 $2000g \times 15min$ 离心后取上清;
- (2)将离心后的血浆与PBS混合后进行超速离心;
- (3) $4^{\circ}C$, $80000g \times 30min$ 离心后抽取上清;
- (4)将上清转移入新的超速离心管, $4^{\circ}C$, $110,000g \times 120min$ 离心后,倾斜 $30-60$ 度倾倒入清后,将管倒置放于滤纸上;
- (5)待管内无可见液滴后,使用滤纸在管内壁进行擦拭,避免碰到管底;
- (6)使用PBS反复吹打管底,轻柔重悬管底的沉淀,充分重悬后注入PBS,混匀;
- (7)使用 $220\mu m$ 的PVDF滤膜过滤上述重悬液;
- (8)使用PBS将过滤后的重悬液体积补充后加入超速离心管;
- (9) $4^{\circ}C$, $150,000g \times 120min$ 离心后,倾斜 $30-60$ 度倾倒入清后,将管倒置放于滤纸上;
- (10)待管内无可见液滴后,使用滤纸在管内壁进行擦拭,避免碰到管底;
- (11)加入PBS或裂解液重悬管底的沉淀,得到外泌体;

其中,所述步骤(1)中人血浆:步骤(2)中PBS:步骤(6)中第一次加入的PBS:步骤(6)中第二次加入的PBS:步骤(8)中PBS将过滤后的重悬液体积补充后总体积:步骤(11)中PBS或裂解液的比例 $ml:ml:ml:ml:ml:ml$ 为 $1.5:10:1:4:6.5:0.1$ 。

2. 如权利要求1所述的分离提纯来自血浆的外泌体的方法在科研方面中的应用。

3. 如权利要求1所述的分离提纯来自血浆的外泌体的方法制得的外泌体在科研方面中的应用。

一种分离提纯来自血浆的外泌体的方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,尤其是一种分离提纯来自血浆的外泌体的方法和应用。

背景技术

[0002] 细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)是外泌体(exosomes)、微囊泡(microvesicle)和凋亡小体等细胞释放的带有膜结构小体的总称。其中外泌体是细胞分泌的直径在30-150nm之间的纳米级微囊泡。外泌体起源于细胞核内体,表面是双层脂质膜,富含来自母体细胞的蛋白、脂质、转运RNA和小RNA成分,是细胞间信号传导的重要媒介。双层脂质膜不仅可保护外泌体携带的成分长时间保持生物学活性,而且可使得外泌体携带大分子蛋白穿过血脑或血眼屏障。

[0003] 外泌体由于有双层脂质膜的保护,其包裹的蛋白质和RNA成分可长时间保持稳定不被降解,因此外泌体中的蛋白较血浆蛋白稳定性更好。由于具有双层脂质膜结构,外泌体还可通过血脑、血眼生物学屏障。目前,外泌体已用于多种疾病的诊断和发病机制研究,例如,血清中携带磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1的外泌体可作为早期胰腺癌诊断的生物学标记物;血浆外泌体中 α 突触核蛋白的表达水平可作为帕金森患者的生物学标记物,反映脑内疾病的严重程度。外泌体已经成为近几年生命科学领域研究热点,具有很大的学术及应用价值。

[0004] 目前市场上的外泌体提取试剂盒,多数采用多聚物沉淀及密度梯度离心,但是提取的外泌体受聚合物影响,往往不纯。超速离心作为传统并有效地分离外泌体的方法仍在被绝大多数研究者使用。传统的超速离心方法,传统的超速离心方法对于中等大小囊泡的离心力为10000g-20000g,且未使用PVDF膜过滤,对其去除效果不佳,对于回收外泌体的离心力为110,000g,离心力不够,最终导致对外泌体的回收率极低,往往需要多个病例的血浆外泌体混合成一个样品进行分析,而临床样本的差异较大,混合样本可造成结果假阳性。另一方面,传统超速离心或试剂盒提取法常伴有血浆高丰度蛋白的污染,严重影响了下游实验的进行。所以,目前亟待一种获取纯度、浓度较高的外泌体的方法。

[0005] 通过检索,尚未发现与本发明专利申请相关的专利公开文献。

发明内容

[0006] 本发明目的在于克服现有技术的不足之处,提供一种分离提纯来自血浆的外泌体的方法和应用,该方法成本低廉,提取的外泌体纯度高,含量高,为科研提供了保障。

[0007] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0008] 一种分离提纯来自血浆的外泌体的方法,步骤如下:

[0009] (1)取人血浆,经2000g \times 15min离心后取上清;

[0010] (2)将离心后的血浆与PBS混合后进行超速离心;

[0011] (3)4 $^{\circ}$ C, 80000g \times 30min离心后抽取上清;

[0012] (4)将上清转移入新的超速离心管,4 $^{\circ}$ C, 110,000g \times 120min离心后,倾斜30-60度倾

倒上清后,将管倒置放于滤纸上;

[0013] (5)待管内无可见液滴后,使用滤纸在管内壁进行擦拭,避免碰到管底;

[0014] (6)使用PBS反复吹打管底,轻柔重悬管底的沉淀,充分重悬后注入PBS,混匀;

[0015] (7)使用220 μ m的PVDF滤膜过滤上述重悬液;

[0016] (8)使用PBS将过滤后的重悬液体积补充后加入超速离心管;

[0017] (9)4 $^{\circ}$ C,150,000g \times 120min离心后,倾斜30-60度倾倒入上清后,将管倒置放于滤纸上;

[0018] (10)待管内无可见液滴后,使用滤纸在管内壁进行擦拭,避免碰到管底;

[0019] (11)加入PBS或裂解液重悬管底的沉淀,得到外泌体;

[0020] 其中,所述步骤(1)中人血浆:步骤(2)中PBS:步骤(6)中第一次加入的PBS:步骤(6)中第二次加入的PBS:步骤(8)中PBS将过滤后的重悬液体积补充后总体积:步骤(11)中PBS或裂解液的比例ml:ml:ml:ml:ml:ml为1.5:10:1:4:6.5:0.1。

[0021] 如上所述的分离提纯来自血浆的外泌体的方法在科研方面中的应用。

[0022] 如上所述的分离提纯来自血浆的外泌体的方法制得的外泌体在科研方面中的应用。

[0023] 本发明取得的优点和积极效果为:

[0024] 1、本发明方法结合了超速离心以及滤膜过滤的方法,操作简单,可以从较小量的血浆中提取外泌体,所提取的外泌体含量较多,可以用于一系列生物学实验。

[0025] 2、本发明方法使用梯度离心法,与传统离心速度不同,最大限度的回收血浆中的外泌体。可以从临床患者少量血浆样本中提取较多的外泌体蛋白进行后续实验。避免了以往混合临床样本造成的误差。

[0026] 3、本发明方法采取超速离心结合滤膜过滤法,回收所得的外泌体粒径集中,纯度较高。

[0027] 4、本发明方法采取倾倒入加PBS洗涤,结合梯度离心,可以去除血浆中的高丰度蛋白,所得外泌体具有独特的蛋白分布。

附图说明

[0028] 图1为本发明方法的一种工艺流程图;

[0029] 图2为本发明方法制得的外泌体的蛋白浓度图;

[0030] 图3为本发明方法制得的外泌体的考马斯亮蓝染色结果图;

[0031] 图4为本发明方法制得的外泌体的粒径检测图与传统离心方法粒径检测图的对比图;

[0032] 图5为本发明方法制得的外泌体的电镜照片图;

[0033] 图6为本发明方法制得的外泌体表达CD63、CD9等外泌体标记蛋白图。

具体实施方式

[0034] 下面详细叙述本发明的实施例,需要说明的是,本实施例是叙述性的,不是限定性的,不能以此限定本发明的保护范围。

[0035] 本发明中所使用的原料,如无特殊说明,均为常规的市售产品;本发明中所使用的

方法,如无特殊说明,均为本领域的常规方法。

[0036] 一种分离提纯来自血浆的外泌体的方法,步骤如下:

[0037] (1)取人血浆,经2000g×15min离心后取上清;

[0038] (2)将离心后的血浆与PBS混合后进行超速离心;

[0039] (3)4℃,80000g×30min离心后抽取上清;

[0040] (4)将上清转移入新的超速离心管,4℃,110,000g×120min离心后,倾斜30-60度倾倒入上清后,将管倒置放于滤纸上;

[0041] (5)待管内无可见液滴后,使用滤纸在管内壁进行擦拭,避免碰到管底;

[0042] (6)使用PBS反复吹打管底,轻柔重悬管底的沉淀,充分重悬后注入PBS,混匀;

[0043] (7)使用220μm的PVDF滤膜过滤上述重悬液;

[0044] (8)使用PBS将过滤后的重悬液体积补充后加入超速离心管;

[0045] (9)4℃,150,000g×120min离心后,倾斜30-60度倾倒入上清后,将管倒置放于滤纸上;

[0046] (10)待管内无可见液滴后,使用滤纸在管内壁进行擦拭,避免碰到管底;

[0047] (11)加入PBS或裂解液重悬管底的沉淀,得到外泌体;

[0048] 其中,所述步骤(1)中人血浆:步骤(2)中PBS:步骤(6)中第一次加入的PBS:步骤(6)中第二次加入的PBS:步骤(8)中PBS将过滤后的重悬液体积补充后总体积:步骤(11)中PBS或裂解液的比例ml:ml:ml:ml:ml:ml为1.5:10:1:4:6.5:0.1。

[0049] 如上所述的分离提纯来自血浆的外泌体的方法能够应用在科研方面中。

[0050] 如上所述的分离提纯来自血浆的外泌体的方法制得的外泌体能够应用在科研方面中。

[0051] 具体地,相关制备如下:

[0052] 一种分离提纯来自血浆的外泌体的方法,步骤如下:

[0053] 1) 血浆收集:经静脉取血取10ml全血至EDTA抗凝管,经1800g×10min、4℃离心分离出4ml左右血浆,或从市场上购买人血浆产品,取1.5ml用于下述方法的外泌体分离。

[0054] 2) 取1.5ml血浆经2000g×15min离心后抽取上清。

[0055] 3) 将离心后的1.5ml血浆与10mlPBS混合后加入超速离心管。

[0056] 4) 4℃,80000g×30min离心后抽取上清

[0057] 5) 将上清转移入新的超速离心管,4℃,110,000g×120min离心后,倾斜30-60度倾倒入上清后,将管倒置放于滤纸上。

[0058] 6) 待管内无可见液滴后,使用滤纸在管壁进行擦拭,避免碰到管底。

[0059] 7) 使用1mlPBS反复吹打管底,轻柔重悬管底的沉淀,充分重悬后注入4mlPBS,混匀。

[0060] 8) 使用220μm的PVDF滤膜过滤上述重悬液。

[0061] 9) 使用PBS将过滤后的重悬液体积补充至11.5ml加入超速离心管

[0062] 10) 4℃,150,000g×120min离心后,倾斜30-60度倾倒入上清后,将管倒置放于滤纸上

[0063] 11) 待管内无可见液滴后,使用滤纸在管壁进行擦拭,避免碰到管底。

[0064] 12) 加入适量PBS或裂解液重悬管底的沉淀,得到外泌体。

[0065] 本实施例中所以使用到的超速离心机为:Beckman coulter Optima XE-90Ultracentrifuge转子型号:SW41 Ti。

[0066] 本发明方法制得的外泌体的相关检测及结果:

[0067] 检测:

[0068] 1、BCA蛋白含量测定

[0069] 根据BCA试剂盒 (Solarbio,PC0020) 定量分析得到每次经超速离心法后得到的蛋白含量。具体方法:使用30 μ L,浓度为0.1%的TritonX-100重悬超速离心管底,混匀后取10 μ L重悬液加入40 μ L PBS稀释液,按照试剂商提供的方法建立标准曲线,将稀释后的液体取20 μ L加入测量孔中,每个样品设立2个副孔。加入反应液后在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟,经酶标仪450nm检测,得出OD值,根据标准曲线计算总蛋白量。

[0070] 2、考马斯亮蓝染色

[0071] 从血浆和外泌体中各提取总蛋白8 μ g,并添加上样缓冲液,然后在95 $^{\circ}$ C下加热5分钟使样品变性。将样本加入具有5%聚丙烯酰胺的SDS-PAGE凝胶中的各个孔中,对蛋白质进行电泳处理,并在凝胶上用10%聚丙烯酰胺分离。分离后,将凝胶转移至装有考马斯亮蓝溶液的塑料盒中1-2小时(购自CBB R-250)。然后将染色的凝胶从染色溶液中移出,使用脱色液清洗至获得清晰的图像。

[0072] 3、Nano Sight粒子直径检测

[0073] 收集外泌体用PBS稀释至1mL,使用纳米颗粒跟踪分析软件(Nanoparticle Tracking Analysis,NTA)NTA 3.3Dev Build 3.3.104进行检测,设置温度为25 $^{\circ}$ C,激光设置为Blue488,流速设置为50,模式为自动检测,进样三次,分析三次,取峰值平均值为Mode粒径结果。

[0074] 4、透射电镜

[0075] 取分装后的外泌体,解冻后重悬于200 μ L PBS液中混匀,取10 μ L外泌体溶液和4% PFA按1:1混合,滴在干净的塑料薄膜上形成液滴,然后将电镜碳网的正面扣在液滴上,放置20min,10 μ L磷钨酸负染90s,烤干碳网,使用HitacW-7500透射电子显微镜进行观察并拍照。

[0076] 5、Western Blot

[0077] 根据BCA试剂盒定量分析得到的蛋白浓度,分别调整不同分组的上样量体积,每组以20 μ g的总蛋白量进行上样,以10% SDS-PAGE胶通过恒压电泳来分离蛋白复合物(浓缩胶80V电压,分离胶110V电压,通过预染蛋白Marker在胶中的分散程度决定分离胶的跑胶时间,待跑胶结束后以半干转印法将分离的蛋白条带转印至PVDF膜后,5%脱脂奶粉室温封闭1h,一抗anti-CD9,anti-CD63,4度过夜孵育,TBST洗膜10min,重复3次;加入HRP标记的二抗室温孵育1h,PBS洗膜10min,重复3次;最后加入化学发光底物ECL进行曝光并拍照,以检测靶蛋白表达。

[0078] 结果:

[0079] 1、本发明离心方法流程,如图1所示。取1.5ml血浆进行2000g \times 15分钟的离心,弃去细胞碎片,上清经80000g \times 30分钟离心弃去中等大小的囊泡,上清进行110,000g \times 120分钟的离心,得到沉淀,经PVDF膜过滤后,进行150,000g \times 120分钟的离心,得到纯化的外泌体。以上过程均在4 $^{\circ}$ C下进行。

[0080] 2、BCA

[0081] 本发明方法所得外泌体,取1.5ml血浆进行离心,使用0.1%TritonX-100裂解沉淀,所得蛋白浓度较高,结果见图2。总蛋白量在12~16ug之间。该蛋白量足够进行蛋白质组学,免疫印迹分析和酶联免疫吸附试验等。

[0082] 3、考马斯亮蓝染色

[0083] 对血浆及外泌体进行染色,可见两组成分的蛋白质分布不同:外泌体在250kD下方及95kD下方有两条明显区别于血浆成分的蛋白质条带。血浆中的高丰度蛋白集中在72kD及55kD,在外泌体的相应条带中未见高丰度蛋白聚集。本发明方法得到的外泌体中没有血浆高丰度蛋白的污染,结果见图3。

[0084] 4、NTA

[0085] 本发明方法离心所得外泌体,稀释至1ml,经粒径检测,Mode值为107.6nm,10%的粒子小于77.1nm ($D_{10}=77.1\text{nm}$),50%的粒子小于112.5nm ($D_{50}=112.5\text{nm}$),90%的粒子小于178.1nm ($D_{90}=178.1\text{nm}$)。其中150nm以下粒子占比为81.49%,绝大部分粒子介于50nm-200nm之间。而传统离心方法所得150nm以下粒子仅占21.62%,本发明方法大幅提高了外泌体占比,纯度较高,结果见图4。

[0086] 5、透射电镜

[0087] 本离心方法所得外泌体电镜下照片,可见大部分为双层囊泡结构,呈茶托样。粒子尺寸介于50-200nm之间,结果见图5。

[0088] 6、Western Blot

[0089] 本发明方法所得外泌体表达CD63、CD9蛋白,CD63和CD9为外泌体表面特有的蛋白标记物。说明本离心方法所得外泌体中含有大量的外泌体成分。结果见图6。

[0090] 尽管为说明目的公开了本发明的实施例,但是本领域的技术人员可以理解:在不脱离本发明及所附权利要求的精神和范围内,各种替换、变化和修改都是可能的,因此,本发明的范围不局限于实施例所公开的内容。

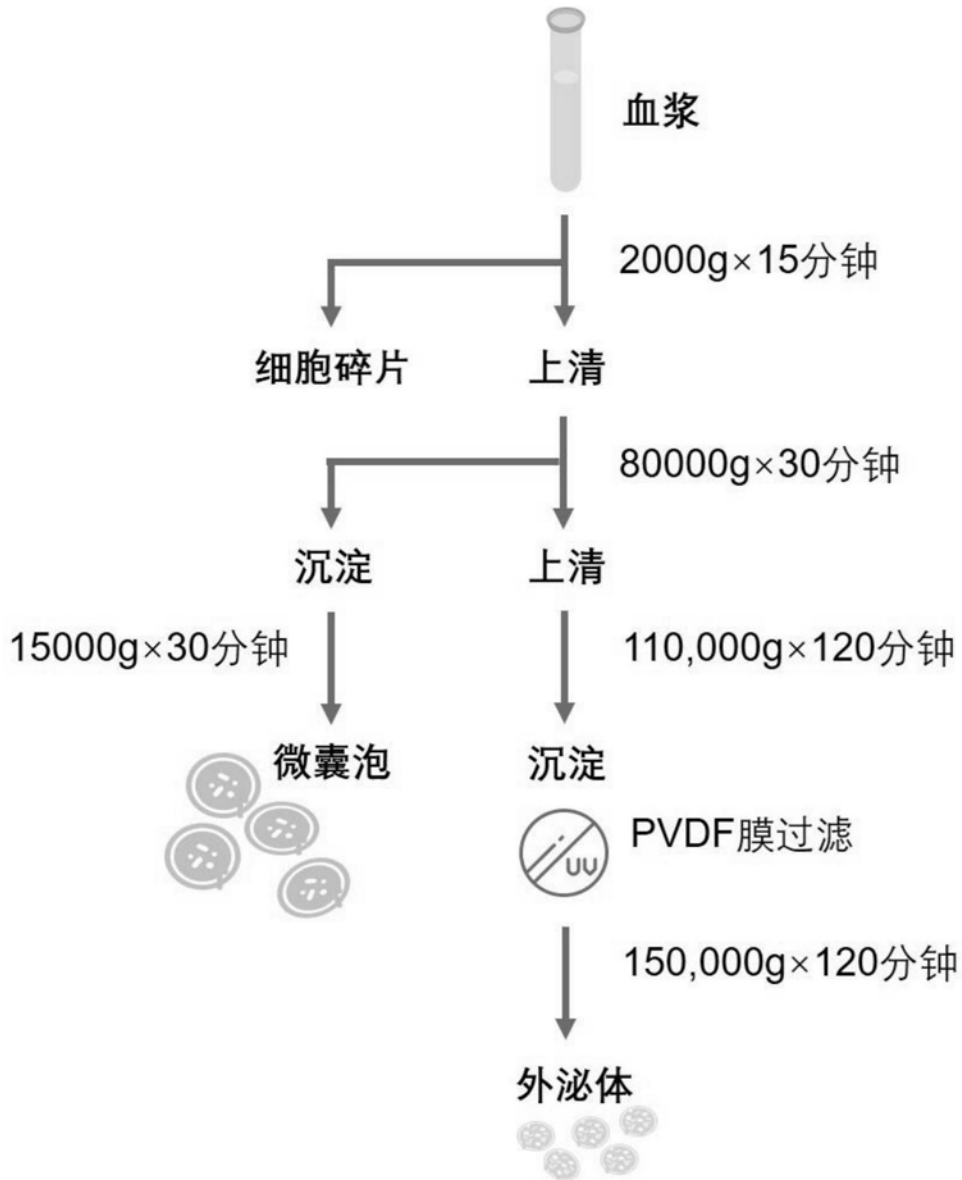


图1

	外泌体-1	外泌体-2	外泌体-3	外泌体-4	外泌体-5
总蛋白量 (ug)	15.7	14.3	12.68	13.4	13.47

图2

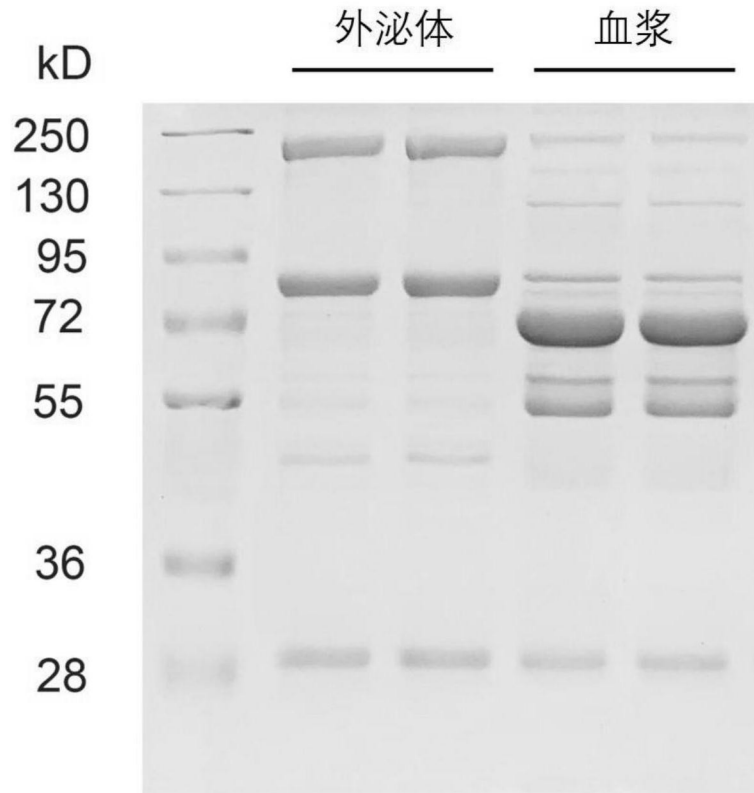


图3

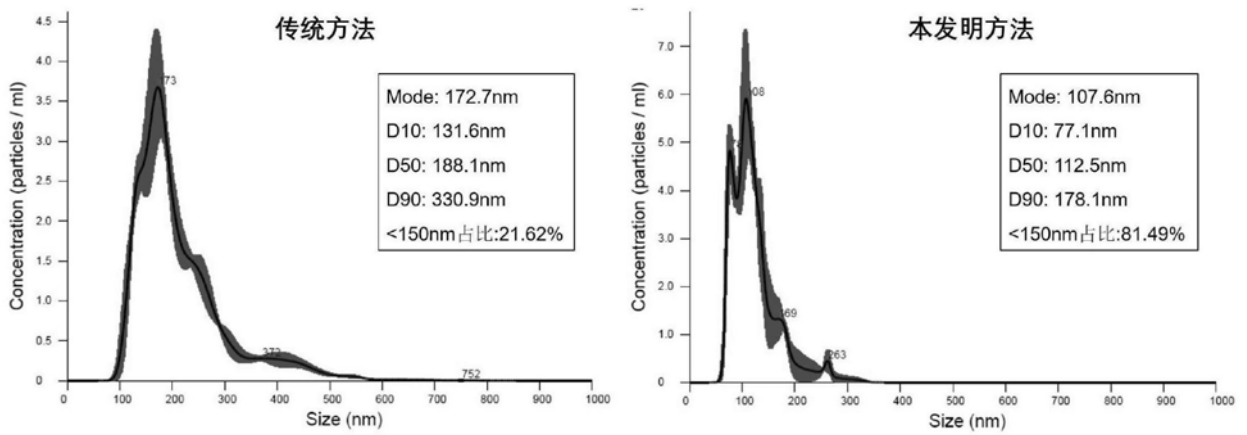


图4

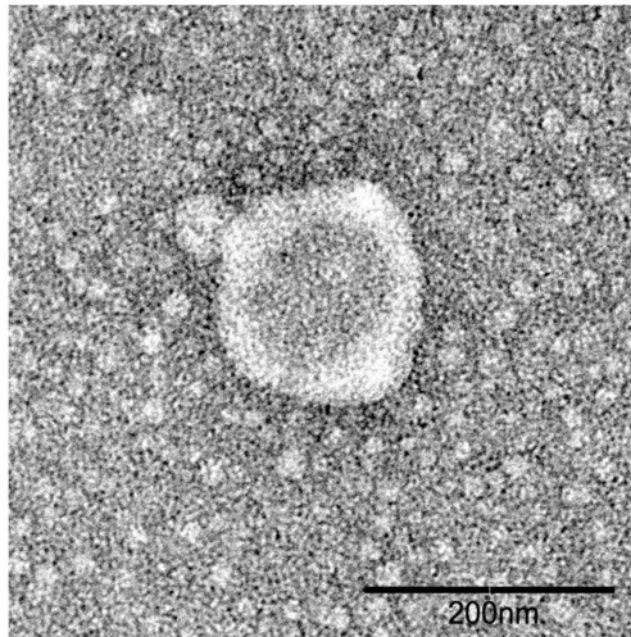


图5

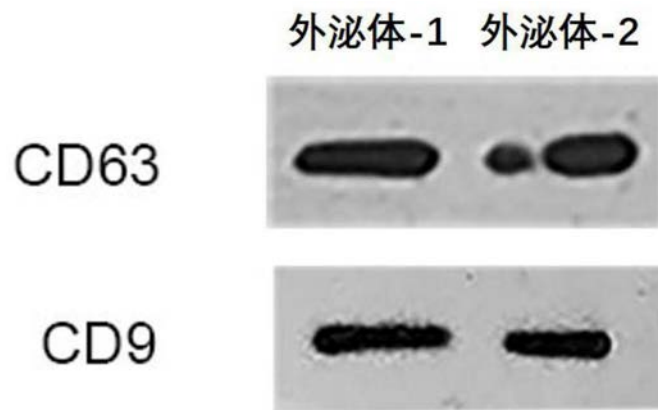


图6