



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106544317 A

(43)申请公布日 2017.03.29

(21)申请号 201610975313.8

(22)申请日 2016.11.07

(71)申请人 四川农业大学

地址 611130 四川省成都市温江区惠民路
211号

(72)发明人 邱婉玲 马继登 张进威 龙科任
李明洲 李学伟 王誉杰 刘灿
胡紫惠 赵瀚

(74)专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理
有限公司 11246

代理人 夏艳

(51)Int.Cl.

C12N 5/076(2010.01)

权利要求书2页 说明书10页

(54)发明名称

一种从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体的方法

(57)摘要

本发明提供一种从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体的方法,步骤为:采集公猪精液按比例稀释,经过滤后离心分离沉淀和上清液;沉淀用体细胞裂解液裂解后再经离心沉降精子细胞得到精子细胞沉淀;上清液离心后保留上清,连续过滤除掉其中的细胞碎片,再通过超高速离心沉淀exosome,加入PBS溶液悬浮exosome。抽提精子细胞和exosome悬浮液中的总RNA,反转录mRNA和miRNA,并通过定量标记mRNA和miRNA对细胞和exosome纯度进行检测。本发明方法可提高猪精液精子细胞和exosome的分离准确率,并有效保证分离后的精子细胞和exosome的纯度,操作方法简单易行、杂质少。

1. 一种从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体的方法,其特征在于,步骤包括:

(1) 将采集到的公猪精液用精液稀释液按比例稀释,经40 μ m过滤器过滤掉精液中的组织碎片和杂物,再通过离心分离沉淀和上清液;

(2) 沉淀用体细胞裂解液裂解后再经离心沉淀精子细胞,加入PBS溶液清洗、重悬精子细胞,再离心后得到精子细胞沉淀;

(3) 上清液经离心后再保留上清液,连续通过0.45 μ m和0.22 μ m过滤器过滤掉exosome中的细胞碎片,再通过超高速离心沉淀exosome,加入PBS溶液悬浮exosome;

(4) 用Trizol法抽提精子细胞和exosome悬浮液中的总RNA,分别进行mRNA以及miRNA反转录和相关基因的定量,并对纯度进行检测。

2. 根据权利要求1所述从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体的方法,其特征在于,步骤(1)具体操作如下:

1) 将采集到的公猪精液用精液稀释液按1:1的比例稀释;

2) 将稀释后的精液在室温下溶解20min;

3) 再将稀释后精液放在37 $^{\circ}$ C水浴锅中孵育15min;

4) 将孵育后的精液混匀,通过40 μ m的过滤器过滤掉精液中的组织碎片和杂物;

5) 将过滤后的精液用冷冻离心机在4 $^{\circ}$ C条件下1000 \times g离心10min,离心后轻轻取出不要震荡摇晃,分离上清液和沉淀,将上清液和沉淀分别收入离心管中。

3. 根据权利要求2所述从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体的方法,其特征在于,步骤1)中,所述精液稀释液配方为右旋葡萄糖27.5g/L、柠檬酸钠6.9g/L、碳酸氢钠1g/L、EDTA2.35g/L、柠檬酸2.9g/L、二羟甲(基)氨基甲烷5.065g/L、硫酸多黏霉素(B)0.0169g/L、硫酸庆大霉素0.15g/L和双蒸水。

4. 根据权利要求1所述从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体的方法,其特征在于:步骤(2)具体操作如下:

1) 向收入离心管中的沉淀中按体积比为8:1加入体细胞裂解液,混匀,放在冰上孵育40min;

2) 将孵育后的沉淀用冷冻离心机在4 $^{\circ}$ C的条件下600 \times g离心5min,离心后弃上清保留沉淀;

3) 沉淀中加入其体积25%的PBS溶液混匀,混匀后再用冷冻离心机在4 $^{\circ}$ C的条件下600 \times g离心5min,离心后弃上清保留沉淀,重复2次。

5. 根据权利要求4所述从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体的方法,其特征在于:步骤1)中,所述体细胞裂解液配方为:SDS 0.001g/mL、Triton-100 5 μ L/mL和DEPC。

6. 根据权利要求1所述从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体的方法,其特征在于,步骤(3)具体操作如下:

1) 上清液在4 $^{\circ}$ C的条件下10000 \times g离心45min,弃沉淀保留上清液;

2) 将上清液连续通过0.45 μ m和0.22 μ m过滤器过滤;

3) 将上清液在超高速离心机中130000 \times g离心90min;

4) 离心后倒掉上清液,用100 μ L PBS溶液重新溶解悬浮exosome。

7. 根据权利要求1所述从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体的方法,其特征在于,步骤(4)具体步骤为:

- 1) 提取精子总RNA和精液exosome总RNA进行反转录;
 - 2) 向得到的反转录反应液中添加RNase Free dH₂O稀释4倍;
 - 3) 用鱼精蛋白以及内参基因GAPDH进行定量,检测鱼精蛋白在精子细胞和精液exosome中的表达量,反应体系为SYBR premix Taq II 5.0μL、上游引物0.5μL、下游引物0.5μL、cDNA 1.0μL、DEPC补足10μL;
 - 4) 根据荧光定量结果,分别对精子细胞和精液exosome中鱼精蛋白和内参基因GAPDH的相对表达量进行计算,当平均差异倍数大于40倍时,精子细胞成功分离;
 - 5) 提取精子细胞总RNA和精液exosome总RNA进行miRNA反转录;
 - 6) 反转录反应液中添加RNase Free dH₂O稀释5倍;
 - 7) 选取在在精液exosome中已经鉴定出的高表达miRNA:let-7b、miR-148a、let-7a、miR-375、miR-99a、miR-27b、miR-34c,以及内参基因U6进行定量,反应体系为:2×SYBR mix 5.0μL、miRNA-specific primer 0.5μL、mRQ 3' Primer 0.5μL、cDNA1.0μL、DEPC补足10μL体系;
 - 8) 根据荧光定量结果,分别对精子细胞和精液exosome中miRNA和内参基因U6的相对表达量进行计算当平均差异倍数大于40倍时,精液exosome成功分离。
8. 根据权利要求7所述从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体的方法,其特征在于,步骤1)中,所述精子总RNA和精液exosome总RNA反转录包括两个步骤,步骤一为:5×gDNA Eraser buffer 2.0μL、gDNA Eraser 1.0μL、TotalRNA 1.0μL和RNase Free dH₂O 6.0μL,反应条件为42℃2min;步骤二为:Prime Script RT Enzyme Mix I 1.0μL、RT Primer Mix 1.0μL、5×Prime Script Buffer 2 4.0μL、RNase Free dH₂O 4.0μL、步骤一反应液10.0μL,反应条件为37℃15min,85℃5s。

一种从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体的方法

技术领域

[0001] 本发明属于细胞生物学领域,具体涉及一种从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体(exosome)的方法。

背景技术

[0002] 正常精液是一种粘稠的液体混合物,由精子和精浆组成。

[0003] 精子是雄性动物的生殖细胞。在哺乳动物精子发生过程中,原生殖细胞发育成为精原细胞,再发育为精母细胞,精母细胞经过两次减数分裂成为圆形精细胞,这些圆形精细胞经过精子形成(spermiogenesis)的变态发育过程,排除大部分细胞质,内部发生一系列变化,成为精子。成熟的精子(spermatozoon)的结构可分为头、颈和尾3部分。人们一直认为精子结构对受精成功有十分重要的影响,现在发现它在受精后的生命活动中,发挥更重要的作用。精子基因组的组成及其结构的准确性,深刻的影响着受精、胚胎发生和胎儿出生后的成活。因此,对于精子细胞的研究已经变得更加深入。

[0004] 哺乳动物的精浆中含有由高浓度胆固醇、鞘磷脂以及结构复杂蛋白质等成分组成的膜性囊泡(exosome),在形态学和分子组成上与外泌体一致,所以我们使用术语“精液外泌体”(seminal exosomes,SE)。相关研究表明精液外泌体除了富含蛋白质、脂类,还含有很多非编码RNA如tRNA、miRNA、piwi-RNA、YRNA、rRNA和mRNA。猪精浆exosome能抑制精子表现出精子顶端膜胆固醇的外流以及膜的流动性,以及14-kD多肽蛋白的络氨酸磷酸化消失,而这些都和精子具备受精能力的激活有关。Exosomes被释放到细胞外不仅仅是为了单纯地清除细胞内废弃的蛋白,它还参与了细胞间的通讯。其能够作为细胞间的载体,传递生物的生理和病理信息,参与了多种不同的生理及病理过程。目前对exosomes的研究不仅仅在其功能方面,更涉及到实际的应用——即诊断和治疗方法方面的开发。鉴于exosomes含有大量的转运蛋白、mRNA、microRNA等生物信息,能调节免疫反应、血管新生、细胞增殖以及肿瘤细胞侵袭,其可以作为非常理想的生物标记物来源,有望在多种疾病的早期诊断中发挥作用。因此,对于猪精液exosome的研究已经变得越来越广泛和深入。

[0005] 为了避免精子细胞中含有体细胞污染,本发明在精液离心后的沉淀中加入体细胞裂解液,去除精子细胞中的体细胞污染,能够有效提高精子细胞的纯度。精液exosome提取常用的方法是超高速离心法,超高速度的方法主要是通过差速离心的办法先去除细胞和细胞碎片,最后利用超高速离心的方法分离exosome。

发明内容

[0006] 本发明针对上述存在的问题做出改进,即本发明要解决的技术问题是提供一种从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体(exosome)的方法,该方法可以有效的分离、提纯精子细胞和精液exosome,并检测精子细胞和精液exosome的纯度。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是:一种从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体的方法,步骤包括:

[0008] (1) 将采集到的公猪精液用精液稀释液按比例稀释,经40 μ m过滤器过滤掉精液中的组织碎片和杂物,再通过离心分离沉淀和上清液;

[0009] (2) 沉淀用体细胞裂解液裂解后再经离心沉淀精子细胞,加入PBS溶液清洗、重悬精子细胞,再离心后得到精子细胞沉淀;

[0010] (3) 上清液经离心后再保留上清液,连续通过0.45 μ m和0.22 μ m过滤器过滤掉exosome中的细胞碎片,再通过超高速离心沉淀exosome,加入PBS溶液悬浮exosome;

[0011] (4) 用Trizol法抽提精子细胞和exosome悬浮液中的总RNA,分别进行mRNA以及miRNA反转录和相关基因的定量,并对纯度进行检测。

[0012] 进一步的:步骤(1)具体操作如下:

[0013] 1) 将采集到的公猪精液用精液稀释液按1:1的比例稀释;

[0014] 2) 将稀释后的精液在室温下溶解20min;

[0015] 3) 再将稀释后精液放在37 $^{\circ}$ C水浴锅中孵育15min;

[0016] 4) 将孵育后的精液混匀,通过40 μ m的过滤器过滤掉精液中的组织碎片和杂物;

[0017] 5) 将过滤后的精液用冷冻离心机在4 $^{\circ}$ C条件下1000 \times g离心10min,离心后轻轻取出不要震荡摇晃,分离上清液和沉淀,将上清液和沉淀分别收入离心管中。

[0018] 进一步的:步骤1)中,所述精液稀释液配方为右旋葡萄糖27.5g/L、柠檬酸钠6.9g/L、碳酸氢钠1g/L、EDTA2.35g/L、柠檬酸2.9g/L、二羟甲(基)氨基甲烷5.065g/L、硫酸多黏霉素(B)0.0169g/L、硫酸庆大霉素0.15g/L和双蒸水。

[0019] 进一步的:步骤(2)具体操作如下:

[0020] 1) 向收入离心管中的沉淀中按体积比为8:1加入体细胞裂解液,混匀,放在冰上孵育40min;

[0021] 2) 将孵育后的沉淀用冷冻离心机在4 $^{\circ}$ C的条件下600 \times g离心5min,离心后弃上清保留沉淀;

[0022] 3) 沉淀中加入其体积25%的PBS溶液混匀,混匀后再用冷冻离心机在4 $^{\circ}$ C的条件下600 \times g离心5min,离心后弃上清保留沉淀,重复2次。

[0023] 进一步的:步骤1)中,所述体细胞裂解液配方为:SDS 0.001g/mL、Triton-100 5 μ L/mL和DEPC。

[0024] 进一步的:步骤(3)具体操作如下:

[0025] 1) 上清液在4 $^{\circ}$ C的条件下10000 \times g离心45min,弃沉淀保留上清液;

[0026] 2) 将上清液连续通过0.45 μ m和0.22 μ m过滤器过滤;

[0027] 3) 将上清液在超高速离心机中130000 \times g离心90min;

[0028] 4) 离心后倒掉上清液,用100 μ L PBS溶液重新溶解悬浮exosome。

[0029] 进一步的:步骤(4)具体步骤为:

[0030] 1) 提取精子总RNA和精液exosome总RNA进行反转录;

[0031] 2) 向得到的反转录反应液中添加RNase Free dH₂O稀释4倍;

[0032] 3) 用鱼精蛋白以及内参基因GAPDH进行定量,检测鱼精蛋白在精子细胞和精液exosome中的表达量,反应体系为SYBR premix Taq II 5.0 μ L、上游引物0.5 μ L、下游引物0.5 μ L、cDNA 1.0 μ L、DEPC补足10 μ L;

[0033] 4) 根据荧光定量结果,分别对精子细胞和精液exosome中鱼精蛋白和内参基因

GAPDH的相对表达量进行计算,当平均差异倍数大于40倍时,精子细胞成功分离;

[0034] 5) 提取精子细胞总RNA和精液exosome总RNA进行miRNA反转录;

[0035] 6) 反转录反应液中添加RNase Free dH₂O稀释5倍;

[0036] 7) 选取在在精液exosome中已经鉴定出的高表达miRNA:let-7b、miR-148a、let-7a、miR-375、miR-99a、miR-27b、miR-34c,以及内参基因U6进行定量,反应体系为:2×SYBR mix 5.0μL、miRNA-specific primer 0.5μL、mRQ 3' Primer 0.5μL、cDNA1.0μL,DEPC补足10μL体系;

[0037] 8) 根据荧光定量结果,分别对精子细胞和精液exosome中miRNA和内参基因U6的相对表达量进行计算当平均差异倍数大于40倍时,精液exosome成功分离。

[0038] 进一步的:步骤1)中,所述精子总RNA和精液exosome总RNA反转录包括两个步骤,步骤一为:5×gDNA Eraser buffer 2.0μL、gDNA Eraser 1.0μL、TotalRNA 1.0μL和RNase Free dH₂O 6.0μL,反应条件为42℃2min;步骤二为:Prime Script RT Enzyme MixI 1.0μL、RT Primer Mix 1.0μL、5×Prime Script Buffer2 4.0μL、RNase Free dH₂O4.0μL、步骤一反应液10.0μL,反应条件为37℃15min,85℃5s。

[0039] 本发明的有益技术效果是:本发明采用体细胞裂解液去除精子细胞中体细胞的污染,有效的提高了精子细胞的纯度;采用细胞筛(连续通过0.45μm和0.22μm过滤器)过滤精液exosome,去除精液exosome中残留的体细胞、精子细胞以及细胞碎片,有效的提高了精液exosome的纯度;超高速离心能够对较大的精液样本进行exosome的分离,且分离出的exosome具有更高的生物活性,从而不会影响后续的实验。

具体实施方式

[0040] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅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作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。

[0041] 实施例1

[0042] 一种从猪精液中分离纯化精子细胞和外泌体的方法,步骤包括:

[0043] (1) 将采集到的公猪精液用精液稀释液按比例稀释,经40μm过滤器过滤掉精液中的组织碎片和杂物,再通过离心分离沉淀和上清液,具体步骤为:

[0044] 1) 将采集到的公猪精液用精液稀释液按1:1的比例稀释;精液稀释液配方为右旋葡萄糖27.5g/L、柠檬酸钠6.9g/L、碳酸氢钠1g/L、EDTA2.35g/L、柠檬酸2.9g/L、二羟甲(基)氨基甲烷5.065g/L、硫酸多黏霉素(B)0.0169g/L、硫酸庆大霉素0.15g/L和双蒸水。

[0045] 2) 将稀释后的精液在室温下溶解20min;

[0046] 3) 再将稀释后精液放在37℃水浴锅中孵育15min;

[0047] 4) 将孵育后的精液混匀,通过40μm的过滤器过滤掉精液中的组织碎片和杂物;

[0048] 5) 将过滤后的精液用冷冻离心机在4℃条件下1000×g离心10min,离心后轻轻取出不要震荡摇晃,分离上清液和沉淀,将上清液和沉淀分别收入离心管中。

[0049] (2) 沉淀用体细胞裂解液裂解后再经离心沉淀精子细胞,加入PBS溶液清洗、重悬精子细胞,再离心后得到精子细胞沉淀,具体步骤为:

[0050] 1) 向收入离心管中的沉淀中按体积比为8:1加入体细胞裂解液,混匀,放在冰上孵育40min;体细胞裂解液配方为:SDS 0.001g/mL、Triton-100 5 μ L/mL和DEPC。

[0051] 2) 将孵育后的沉淀用冷冻离心机在4 $^{\circ}$ C的条件下600 \times g离心5min,离心后弃上清保留沉淀;

[0052] 3) 沉淀中加入其体积25%的PBS溶液混匀,混匀后再用冷冻离心机在4 $^{\circ}$ C的条件下600 \times g离心5min,离心后弃上清保留沉淀,重复2次。

[0053] (3) 上清液经离心后再保留上清液,连续通过0.45 μ m和0.22 μ m过滤器过滤掉exosome中的细胞碎片,再通过超高速离心沉淀exosome,加入PBS溶液悬浮exosome;

[0054] 1) 上清液在4 $^{\circ}$ C的条件下10000 \times g离心45min,弃沉淀保留上清液;

[0055] 2) 将上清液连续通过0.45 μ m和0.22 μ m过滤器过滤;

[0056] 3) 将上清液在超高速离心机中130000 \times g离心90min;

[0057] 4) 离心后倒掉上清液,用100 μ L PBS溶液重新溶解悬浮exosome。

[0058] (4) 用Trizol法抽提精子细胞和exosome悬浮液中的总RNA,分别进行mRNA以及miRNA反转录和相关基因的定量,并对纯度进行检测。

[0059] 1) 提取精子总RNA和精液exosome总RNA进行反转录;精子总RNA和精液exosome总RNA反转录包括两个步骤,步骤一为:5 \times gDNA Eraser buffer 2.0 μ L、gDNA Eraser 1.0 μ L、TotalRNA 1.0 μ L和RNase Free dH₂O 6.0 μ L,反应条件为42 $^{\circ}$ C 2min;步骤二为:Prime Script RT Enzyme Mix I 1.0 μ L、RT Primer Mix 1.0 μ L、5 \times Prime Script Buffer 2 4.0 μ L、RNase Free dH₂O 4.0 μ L、步骤一反应液10.0 μ L,反应条件为37 $^{\circ}$ C 15min,85 $^{\circ}$ C 5s。

[0060] 2) 向得到的反转录反应液中添加RNase Free dH₂O稀释4倍;

[0061] 3) 用鱼精蛋白以及内参基因GAPDH进行定量,检测鱼精蛋白在精子细胞和精液exosome中的表达量,反应体系为SYBR premix Taq II 5.0 μ L、上游引物0.5 μ L、下游引物0.5 μ L、cDNA 1.0 μ L、DEPC补足10 μ L;

[0062] 4) 根据荧光定量结果,分别对精子细胞和精液exosome中鱼精蛋白和内参基因GAPDH的相对表达量进行计算,当平均差异倍数大于40倍时,精子细胞成功分离;

[0063] 5) 提取精子细胞总RNA和精液exosome总RNA进行miRNA反转录;

[0064] 6) 反转录反应液中添加RNase Free dH₂O稀释5倍;

[0065] 7) 选取在在精液exosome中已经鉴定出的高表达miRNA:let-7b、miR-148a、let-7a、miR-375、miR-99a、miR-27b、miR-34c,以及内参基因U6进行定量,反应体系为:2 \times SYBR mix 5.0 μ L、miRNA-specific primer 0.5 μ L、mRQ 3' Primer 0.5 μ L、cDNA 1.0 μ L,DEPC补足10 μ L体系;

[0066] 8) 根据荧光定量结果,分别对精子细胞和精液exosome中miRNA和内参基因U6的相对表达量进行计算当平均差异倍数大于40倍时,精液exosome成功分离。

[0067] 实施例2

[0068] (1) 按1:1的比例加入精液稀释液20mL,混匀,装入50mL离心管中。精液稀释液在采集精液前1小时配制,其成分和配制方法如表1,

[0069] 表1精液稀释液成分及配制

[0070]

试剂	用量 (g)
葡萄糖(右旋糖)	27.5
柠檬酸钠	6.9
碳酸氢钠	1
乙二胺四乙酸二钠	2.35
柠檬酸	2.9
二羟甲(基)氨基甲烷	5.065
硫酸多黏霉素(B)	0.0169
硫酸庆大霉素	0.15

[0071]

双蒸水	1000 mL
-----	---------

[0072] (2) 将稀释后的精液在室温下溶解20min;

[0073] (3) 然后放入37℃水浴锅中孵育15min;

[0074] (4) 将孵育后的精液混匀,通过40μm的过滤器过滤掉精液中的组织碎片和杂物;

[0075] (5) 将过滤后的精液用冷冻离心机在4℃条件下1000×g离心10min,分离上清液和沉淀,将上清液收入一个新的离心管中,沉淀保留在原离心管中;

[0076] (6) 配制5mL体细胞裂解液:在5mL DEPC水中加入25μL Triton-100和0.005g SDS,混匀。在离心后所得沉淀中加入5mL体细胞裂解液,放置在冰上孵育40min,以去除体细胞污染;

[0077] (7) 将孵育后的沉淀用冷冻离心机在4℃的条件下600×g离心5min,以去除裂解后的体细胞碎片,离心后弃上清保留沉淀;

[0078] (8) 用PBS溶液清洗、重悬精子细胞,其中每40mL稀释后精液所得沉淀用10mL PBS溶液溶解,加入PBS溶液后混匀,重复2次;

[0079] (9) 混匀后再用冷冻离心机在4℃的条件下600×g离心5min,以去除残留的体细胞碎片,离心后弃上清保留沉淀;

[0080] (10) 在所得沉淀中加入1mL Trizol试剂,进行精子细胞总RNA抽提;

[0081] (11) 将(5)步骤中得到的上清液在4℃条件下10000×g离心45min,以去除精液exosome中的细胞及组织碎片,离心后将上清液转移到一个新的离心管中,弃掉沉淀;

[0082] (12) 将上清液连续通过0.45μm和0.22μm过滤器过滤掉exosome中的细胞碎片;

[0083] (13) 将上清液转入超高速离心机中,在超高速离心机中130000×g离心90min;

[0084] (14) 超高速离心后,倒掉上清液,用100μL PBS溶液重新溶解悬浮exosome;

[0085] (15) 每200 μ L exosome悬浮液样本加0.8mL Trizol试剂,进行精液exosome总RNA抽提;

[0086] 实施例3

[0087] 对抽提出的精子细胞总RNA和精液exosome总RNA分别进行mRNA以及miRNA反转录和相关基因的定量,并对纯度进行检测。

[0088] (1) 首先分别对精子总RNA和精液exosome总RNA进行mRNA反转录,分为两个步骤,步骤一反应体系如表2,

[0089] 表2 mRNA反转录步骤一体系

试剂	体积 (μ L)
5 \times gDNA Eraser buffer	2.0 μ L
[0090] gDNA Eraser	1.0 μ L
Total RNA	1.0 μ L
RNase Free dH ₂ O	6.0 μ L

[0091] 反应条件为42 $^{\circ}$ C 2min;

[0092] 步骤二反应体系如表3,

[0093] 表3 mRNA反转录步骤二体系

试剂	体积 (μ L)
Prime Script RT Enzyme Mix I	1.0 μ L
[0094] RT Primer Mix	1.0 μ L
5 \times Prime Script Buffer 2	4.0 μ L
RNase Free dH ₂ O	4.0 μ L
步骤一反应液	10.0 μ L

[0095] 反应条件为37 $^{\circ}$ C 15min \rightarrow 85 $^{\circ}$ C 5s;

[0096] (2) 向得到的反转录反应液中添加RNase Free dH₂O补足至80 μ L,稀释4倍;

[0097] (3) 取1 μ L稀释液加入到下一步的Real Time PCR反应体系中,进行定量检测。反应体系如表4,每次每板上设置样品(重复3次)、一个阳性对照和一个阴性对照,表7为mRNA定量Ct值比较,

[0098] 表4 Real Time PCR反应体系(mRNA)

试剂	体积 (μL)
SYBR premix Taq II	5.0 μL
[0099] 上游引物	0.5 μL
下游引物	0.5 μL
cDNA	1.0 μL
DEPC 水	3.0 μL

[0100] 表7 mRNA定量Ct值比较

[0101]

种类	C _t 值 (科学计数法)		相对表达量 (mRNA 表达量/内参基因表达量)		差异倍数 (精子中 mRNA 表达量/精液 exosome 中 mRNA 表达量)
	精子		精子		
PRM-1	精子	1.79E-08	精子	6.84E+02	40.4
	Exosome	3.72E-10	Exosome	1.69E+01	
GAPDH (PRM-1)	精子	2.62E-11			
	Exosome	2.20E-11			
PRM-2	精子	3.62E-09	精子	1.91E+02	526
	Exosome	2.38E-11	Exosome	3.64E-01	

[0102]

GAPDH (PRM-2)	精子	1.89E-11		
	Exosome	6.53E-11		

[0103] (4) 根据定量结果,精子中鱼精蛋白表达量与精液exosome中鱼精蛋白的差异倍数为40.4和526,表明精子细胞纯度确实是很高的。

[0104] (5) 再对精子细胞总RNA和精液exosome总RNA进行miRNA反转录,反应体系如表5:

[0105] 表5 miRNA反转录体系

	试剂	体积 (μL)
[0106]	2×mRQ buffer	5.0μL
	mRQ enzyme	1.25μL
	Total RNA	3.75μL

[0107] 反应条件为37℃60min→85℃5min;

[0108] (6) 向得到的反转录反应液中添加RNase Free dH₂O补足至100μL,稀释5倍;

[0109] (7) 取1μL稀释液加入到下一步的Real Time PCR反应体系中,进行定量检测。反应体系如表6,每次每板上设置样品(重复3次)、一个阳性对照和一个阴性对照,表8为miRNA定量C_t值比较:

[0110] 表6 Real Time PCR反应体系(miRNA)

	试剂	体积 (μL)
	2×SYBR mix	5.0μL
[0111]	miRNA-specific primer	0.5μL
	mRQ 3' Primer	0.5μL
	cDNA	1.0μL
[0112]	DEPC 水	3.0μL

[0113] 表8 miRNA定量C_t值比较

[0114]

种类	C _t 值 (科学计数法)		相对表达量 (miRNA 表达量/内参基因表达量)		差异倍数 (精液 exosome 中 miRNA 表达量/精子中 miRNA 表达量)
miRNA-375	精子	7.51E-12	精子	8.56E-04	108
	Exosome	5.33E-09	Exosome	9.25E-02	
U6 (miRNA-375)	精子	8.77E-09			
	Exosome	5.76E-08			
MiRNA-27B	精子	1.05E-11	精子	1.20E-03	209
	Exosome	1.45E-08	Exosome	2.52E-01	
U6 (miRNA-27B)	精子	8.77E-09			
	Exosome	5.76E-08			
miRNA-34C	精子	无表达			
	Exosome	1.74E-09			
miRNA-148A	精子	无表达			
	Exosome	9.55E-08			
miRNA-99A	精子	无表达			
	Exosome	8.77E-08			
Let-7a	精子	无表达			
	Exosome	1.15E-07			
Let-7b	精子	无表达			
	Exosome	1.67E-07			

[0115] (8) 根据定量结果,精液exosome与精子细胞中miRNA的差异倍数为108和209,而且大部分miRNA只在精液exosome中表达,表明精液exosome纯度确实是很高的。

[0116] 本技术领域技术人员可以理解,除非另外定义,这里使用的所有术语(包括技术术语和科学术语)具有与本发明所属领域中的普通技术人员的一般理解相同的意义。还应该理解的是,诸如通用字典中定义的那些术语应该被理解为具有与现有技术的上下文中的意义一致的意义,并且除非像这里一样定义,不会用理想化或过于正式的含义来解释。

[0117] 最后所应说明的是:以上实施例仅用以说明而非限制本发明的技术方案,尽管参

照上述实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应该理解:依然可以对本发明进行修改或者等同替换,而不脱离本发明的精神和范围的任何修改或局部替换,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。