



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109738625 A

(43)申请公布日 2019.05.10

(21)申请号 201910008082.7

(22)申请日 2019.01.04

(71)申请人 湖南师范大学

地址 410081 湖南省长沙市麓山路36号湖南师范大学

(72)发明人 陈平 寻成峰 卢明 唐凤
葛丽特 李莎

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 刘奇

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

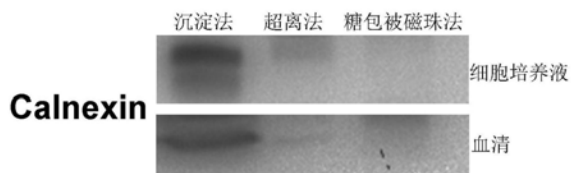
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种捕获纳米磁珠、捕获外泌体的方法和应用

(57)摘要

本发明提供了一种捕获纳米磁珠、捕获外泌体的方法和应用,属于生物技术领域,所述捕获纳米磁珠将纳米磁珠与D-(β)-氨基葡萄糖缩合偶联后得到。采用本发明提供的捕获纳米磁珠捕获外泌体,与超速离心获得外泌体相比,不仅缩短了捕获时间,得到的外泌体稳定,不损伤囊泡;与沉淀法相比,外泌体的纯度高;与免疫磁珠法相比,无需购买昂贵的修饰材料,降低成本。



1. 一种捕获纳米磁珠,其特征在于,将纳米磁珠与D-(β)-氨基葡萄糖缩合偶联后得到。
2. 根据权利要求1所述的捕获纳米磁珠,其特征在于,所述纳米磁珠的官能团包括羧基。
3. 根据权利要求1所述的捕获纳米磁珠,其特征在于,所述捕获纳米磁珠的粒径为3~20nm。
4. 根据权利要求1所述的捕获纳米磁珠,其特征在于,所述纳米磁珠与D-(β)-氨基葡萄糖的质量比为1:(4~8)。
5. 一种捕获外泌体的方法,其特征在于,包括:将样品液与权利要求1~4任一项所述的捕获纳米磁珠混合、孵育,捕获外泌体。
6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述捕获纳米磁珠溶于PBS缓冲液后,得到捕获液后再与样品液混合;所述捕获液中,捕获纳米磁珠的浓度为3~7μg/μl。
7. 根据权利要求5或6所述的方法,其特征在于,所述样品液与捕获液的体积比为(50~200):1。
8. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述孵育的时间为1~3h。
9. 根据权利要求5或8所述的方法,其特征在于,所述孵育的温度为35~42℃。
10. 权利要求1~4任一项所述的捕获纳米磁珠或权利要求5~9任一项所述的方法在捕获外泌体中的应用。

一种捕获纳米磁珠、捕获外泌体的方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种捕获纳米磁珠、捕获外泌体的方法和应用。

背景技术

[0002] 纳米四氧化三铁是纳米材料的一种,具有易于合成、超顺磁性、高饱和磁化强度、生物相容性好、毒性低等优点,被认为是一种良好的磁共振成像(MRI)造影剂和磁热疗的产热材料。外泌体(exosomes)是细胞内的多囊泡体与细胞质膜融合后主动分泌到细胞外的一种大小在30~140nm的小囊泡。外泌体内含有脂质、蛋白质、核酸等活性物质,可通过与靶细胞受体结合或水平转移内含物发挥生物学功能。外泌体作为一种新型的细胞间交流方式在细胞间交流中起重要作用。外泌体膜上存在大量的蛋白质和受体,葡萄糖转运蛋白(GLUT-1)便是其中之一,其来源是母体细胞的细胞膜,是所有细胞转运摄取葡萄糖所必须的一种膜蛋白。同时,由于外泌体包含丰富的母体细胞信息,且易从体液中获得,因此,外泌体检测可能成为一种较为理想的“液体活检”方法,有望成为一种新型的肿瘤标志物,实现对整个肿瘤活动的实时监测,在肿瘤诊疗中极具前途。

[0003] 相比于传统液体活检所检测的细胞游离核酸(cfDNA)和循环肿瘤细胞,外泌体具有以下优势:①外泌体直径较小、通透性强、体液中浓度较高,易被富集分离,有利于发现恶性肿瘤早期诊断标志物;②由于脂质双层膜的保护作用,外泌体包含的母细胞信息能够长期稳定存在并保持一定的生物学活性;③外泌体中含有大量的蛋白质和核酸,尤其是mRNA、lncRNA和circRNA等大RNA分子含量丰富,更容易揭示癌症发展过程中的分子机制。尽管组织活检仍然是肿瘤诊断的金标准,但其具有侵入性和组织样本的局限性,而外泌体检测作为一种微创手段,能够体现肿瘤整体分子信息且可反复取样进行大规模监测,对于实现肿瘤的无创检测和早诊早治具有重要意义。

[0004] 目前常用的提取外泌体的方法有:离心法、沉淀法、免疫磁珠法、等,但这些方法都各有优劣,如:采用单纯超速离心法所获取的外泌体虽然纯度较高,但分离效果稳定性差,可损伤囊泡,需要特殊的设备等;单纯的沉淀法,操作简便,无需特殊的技术设备,但提取的外泌体容易混杂其他一起沉淀的蛋白;免疫磁珠法,则只适用于较小量的外泌体提取且成本昂贵。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种捕获纳米磁珠、捕获外泌体的方法和应用,采用本发明提供的捕获纳米磁珠捕获外泌体,与超速离心获得外泌体相比,不仅缩短了捕获时间,得到的外泌体稳定,不损伤囊泡;与沉淀法相比,外泌体的纯度高;与免疫磁珠法相比,无需购买昂贵的修饰材料,降低成本。

[0006] 本发明提供了一种捕获纳米磁珠,将纳米磁珠与D-(B)-氨基葡萄糖缩合偶联后得到。

- [0007] 优选的,所述纳米磁珠的官能团包括羧基。
- [0008] 优选的,所述捕获纳米磁珠的粒径为3~20nm。
- [0009] 优选的,所述纳米磁珠与D-(β)-氨基葡萄糖的质量比为1:(4~8)。
- [0010] 本发明还提供了一种捕获外泌体的方法,包括:将样品液与权利要求1~4任一项所述的捕获纳米磁珠混合、孵育,捕获外泌体。
- [0011] 优选的,所述捕获纳米磁珠溶于PBS缓冲液后,得到捕获液后再与样品液混合;所述捕获液中,捕获纳米磁珠的浓度为3~7μg/μl。
- [0012] 优选的,所述样品液与捕获液的体积比为(50~200):1。
- [0013] 优选的,所述孵育的时间为1~3h。
- [0014] 优选的,所述孵育的温度为35~42℃。
- [0015] 本发明还提供了上述技术方案所述的捕获纳米磁珠或上述技术方案所述的方法在捕获外泌体中的应用。
- [0016] 本发明提供了的捕获纳米磁珠是将纳米磁珠与D-(β)-氨基葡萄糖缩合偶联后得到,所述捕获纳米磁珠表面的D-(β)-氨基葡萄糖与外泌体表面的葡萄糖转运蛋白(GLUT1)特异性结合,实现捕获外泌体。
- [0017] 本发明实施例的结果显示:采用本发明提供的捕获纳米磁珠捕获外泌体,与超速离心获得外泌体相比,不仅缩短了捕获时间,得到的外泌体稳定,不损伤囊泡;与沉淀法相比,外泌体的纯度高;与免疫磁珠法相比,无需购买昂贵的修饰材料,降低成本。

附图说明

- [0018] 图1为D-(β)-氨基葡萄糖包被纳米磁珠的制备原理示意图;
- [0019] 图2为制备的D-(β)-氨基葡萄糖包被纳米磁珠的透射电镜图;
- [0020] 图3为D-(β)-氨基葡萄糖包被纳米磁珠捕获的外泌体形貌特征透射电镜图;
- [0021] 图4为实例2中提取的外泌体蛋白质的WesternBlot结果图;
- [0022] 图5为实例3中提取的外泌体蛋白质的WesternBlot结果图;
- [0023] 图6为实例4中提取的外泌体纯度验证的WesternBlot结果图;
- [0024] 图7为超速离心分离外泌体的透射电镜图。

具体实施方式

- [0025] 本发明提供了一种捕获纳米磁珠,将纳米磁珠与D-(β)-氨基葡萄糖缩合偶联后得到。
- [0026] 在本发明中,所述纳米磁珠的官能团优选为羧基。在本发明中,纳米磁珠表面的羧基能够与D-(β)-氨基葡萄糖缩合偶联。本发明对所述纳米磁珠的来源没有特殊限定,采用常规市售产品即可。
- [0027] 在本发明中,所述纳米磁珠的粒径优选为3~7nm。
- [0028] 在本发明中,所述缩合偶联优选采用N-羧基琥珀酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐化学偶联法进行。
- [0029] 在本发明中,所述纳米磁珠与D-(β)-氨基葡萄糖的质量比优选为1:(4~8),更优选为1:6。

[0030] 在本发明中,所述捕获纳米抗体的粒径优选为3~20nm,更优选为5~10nm。在本发明中,所述捕获纳米磁珠大小均匀,分散性良好。在本发明中,所述捕获纳米磁珠中,所述纳米磁珠与负载D-(β)-氨基葡萄糖的质量比优选为0.2~2μg:1μg。

[0031] 本发明还提供了一种捕获外泌体的方法,包括:将样品液与上述技术方案所述的捕获纳米磁珠混合、孵育,捕获外泌体。

[0032] 在本发明中,当从血液中捕获外泌体时,所述样品液的制备方法优选包括:将血液进行第一离心,将得到的第一上清液与PBS缓冲液混合后进行第二离心,将得到的第二离心上清液进行超滤,得到的上层液为样品液。

[0033] 本发明优选使用滤膜进行超滤,所述滤膜在超滤管中间,离心后被滤膜分为上下两层,取未被离心下去的滤膜上层液体,即为样品液。

[0034] 本发明对所述血液的来源没有特殊限定。

[0035] 在本发明中,所述第一离心的离心力优选为3000g,所述第一离心的时间优选为30min。在本发明中,所述第一离心能够除去血液中的细胞碎片。

[0036] 在本发明中,所述第一上清液与PBS缓冲液的体积比优选为1:20。在本发明中,所述第二离心的离心力优选为10000g,所述第二离心的时间优选为30min,所述第二离心的温度优选为4℃。

[0037] 在本发明中,所述超滤的离心力优选为4000g,所述超滤的时间优选为20min,所述超滤的温度优选为4℃。在本发明中,所述超滤优选使用Millipore Amicon Ultra-15离心管进行,所述Millipore Amicon Ultra-15离心管的截留分子量优选的为100KDa。

[0038] 在本发明中,当从细胞上清中捕获外泌体时,所述样品液的制备方法优选包括:

[0039] 采用常规方法培养细胞,将得到的细胞上清进行第三离心,将得到的第三上清液再进行第四离心,将得到的第四离心上清液进行超滤,得到的上层液为样品液。

[0040] 在本发明中,所述第三离心的离心力优选为2000g,所述第三离心的时间优选为20min。在本发明中,所述第三离心能够去除细胞碎片。

[0041] 在本发明中,所述第四离心的离心力优选为10000g,所述第四离心的时间优选为30min,所述第四离心的温度优选为4℃。在本发明中,所述第四离心去除大囊泡。

[0042] 在本发明中,所述超滤的离心力优选为4000g,所述超滤的时间优选为20min,所述超滤的温度优选为4℃。在本发明中,所述超滤优选使用Millipore Amicon Ultra-15离心管进行,所述Millipore Amicon Ultra-15离心管的截留分子量优选的为100KDa。

[0043] 在发明中,所述超滤能够提高外泌体的浓度和降低葡萄糖的浓度。

[0044] 本发明优选将捕获纳米磁珠溶于PBS缓冲液后,得到捕获液后再与样品液混合。在本发明中,所述捕获液中,捕获纳米磁珠的浓度优选为3~7μg/μl,更优选为4~6μg/μl,最优选为5μg/μl。

[0045] 在本发明中,所述样品液与捕获液的体积比优选为(50~200):1,更优选为(80~150):1,最优选为(100~120):1。

[0046] 在本发明中,所述孵育的温度优选为35~42℃,更优选为37℃;所述孵育的时间优选为1~3h,更优选为2h。在本发明中,所述孵育优选在摇床中进行。所述摇床的转速优选为50~100rpm,更优选为75rpm。

[0047] 在本发明中,所述PBS缓冲液的pH值优选为7.4~7.6。

[0048] 在本发明中,所述孵育后还优选包括:将得到的孵育物在磁场下收集捕获有外泌体的纳米磁珠,经PBS缓冲液洗涤后,得到外泌体-葡萄糖纳米磁珠,采用常规方法从外泌体-葡萄糖纳米磁珠中分离,得到外泌体。

[0049] 本发明还提供了上述技术方案所述的捕获纳米磁珠或上述技术方案所述的方法在捕获外泌体中的应用。

[0050] 下面结合具体实施例对本发明所述的一种捕获纳米磁珠、捕获外泌体的方法和应用做进一步详细的介绍,本发明的技术方案包括但不限于以下实施例。

[0051] 实施例1

[0052] 羧基修饰的超顺磁纳米微粒基体与葡萄糖的偶联:

[0053] 使用N-羟基琥珀酰亚胺/1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(NHS/EDC)化学偶联的方法,实现对羧基修饰的四氧化三铁纳米粒子的葡萄糖包被。反应在0.1M 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES),0.5MNaCl缓冲液(pH=6.0)体系中进行,将0.4mg的NHS和0.6mg的EDC溶解在1ml的MES缓冲液中,然后添加到200ul(5ug/ul)羧基修饰的四氧化三铁纳米粒子中以激活粒子表面羧基。室温下反应15min后用0.1M的MES,0.5MNaCl缓冲液,通过Millipore Ultrafree 0.5(30kDa),10000g离心过滤去除多余激活剂,离心保留约25ul液体停止,重复3次洗涤。4℃过夜孵育猝灭EDC、NHS。用PBS重悬收集保存置于4℃。后加入6mg D-(β)-氨基葡萄糖盐酸盐,室温反应过夜。次日将包被好葡萄糖的纳米磁珠清洗3次,去除未结合的D-(β)-氨基葡萄糖,然后用200ul PBS重悬,4℃保存备用。D-(β)-氨基葡萄糖包被纳米磁珠的制备原理示意图见图1,制备的D-(β)-氨基葡萄糖包被纳米磁珠透射电镜结果见图2。

[0054] 根据图2可知,透射电镜显示显示,制备的D-(β)-氨基葡萄糖包被纳米磁珠,分散性良好,粒径约为3~20nm。

[0055] 实施例2

[0056] 提取Hela细胞培养上清中的外泌体

[0057] (1) 利用实施例1制备的D-(β)-氨基葡萄糖包被纳米磁珠提取Hela细胞培养上清中的外泌体

[0058] 当细胞融合度达到70%~80%时,除去原培养基并用PBS清洗4次,更换10%无外泌体血清配置的DMEM培养基,培养48小时后收集细胞培养上清液约50ml,室温2000g离心20分钟,弃细胞碎片沉淀;取离心上清液,在4℃下10000g,离心30分钟,弃大囊泡沉淀,收取离心上清。转入Millipore Amicon Ultra-15(截留分子量100KDa)的离心管,在4℃下4000g,离心20分钟。收取滤膜上层液。按照100:1的比例加入制备好的D-(β)-氨基葡萄糖包被纳米磁珠悬液,混匀后在37℃摇床孵育2小时,之后置于磁场中分离磁珠,用1ml的PBS重复清洗三次,清洗完成后,加入100ul PBS进行重悬,得到磁珠-细胞上清外泌体复合物。

[0059] (2) 透射电镜鉴定:取制备好的样品,按体积比=1:1加入4℃的PBS溶液稀释后滴加于2mm的载样铜网上,于室温静置1min后用滤纸将多余液体轻轻吸去,用3%(w/v)磷钨酸钠溶液(pH6.8)室温负染5分钟,用双蒸水轻轻洗一遍后室温晾干,于透射电镜观察并照相、测量其直径。结果显示,在透射电镜下观察,外泌体大小在约100nm,形态呈圆形或者椭圆形膜性囊泡样。染色后可见囊泡有膜状结构。上述特征均符合外泌体的特征,且表面具有5~10nm特异性结合的葡萄糖纳米磁珠(图3)。

[0060] (3) Western blot检测外泌体特异标志蛋白:分别收集提取后上清和外泌体。加入RIPA裂解液裂解,测定蛋白质浓度,平衡上样量进行12%SDS-PAGE电泳。蛋白分离后将其转移至硝酸纤维素膜上,室温下用含5%脱脂牛奶封闭液封闭处理1h。经1×TBST缓冲液洗脱后,分别加入一抗(CD81、CD63单克隆抗体),于4℃条件下反应过夜。经再次洗脱后,室温下避光加入荧光标记的二抗反应1h。再用1×TBST缓冲液洗膜,在化学发光成像仪中扫描显像。Western blot检测外泌体特异性标志蛋白,结果显示(图4)外泌体提取液均表达CD81、CD63蛋白,但提取后的上清不表达这两种外泌体共有标志物(图4)。D-(β)-氨基葡萄糖包被纳米磁珠提取Hela细胞培养上清中的外泌体完全符合外泌体的特征。

[0061] 实施例3

[0062] 提取血清中的外泌体

[0063] (1) 利用实施例1制备的D-(β)-氨基葡萄糖包被纳米磁珠提取血清中的外泌体

[0064] 收集新鲜血清2ml,置于离心机中,室温3000g离心30分钟,弃细胞碎片沉淀,取离心上清液,以1:20(血清:PBS)的体积比例进行稀释,在4℃下10000g,离心30分钟,弃大囊泡沉淀。转入Millipore Amicon Ultra-15(截留分子量100KDa)的离心管,在4℃下4000g,离心20分钟。收取滤膜上层液。按照100:1的比例加入制备好的葡萄糖包被纳米磁珠悬液,混匀后在37℃摇床孵育2小时,之后置于磁场中分离磁珠,用1ml的PBS重复清洗三次,清洗完成后,加入100ul PBS进行重悬,得到磁珠-血清外泌体复合物。

[0065] Western blot检测外泌体特异标志蛋白

[0066] 分别收集提取后上清和外泌体。加入RIPA裂解液裂解,测定蛋白质浓度,平衡上样量进行12%SDS-PAGE电泳。蛋白分离后将其转移至硝酸纤维素膜上,室温下用含5%脱脂牛奶封闭液封闭处理1h。经1×TBST缓冲液洗脱后,分别加入一抗(CD81、CD63单克隆抗体),于4℃条件下反应过夜。经再次洗脱后,室温下避光加入荧光标记的二抗反应1h。再用1×TBST缓冲液洗膜,在化学发光成像仪中扫描显像。Western blot检测外泌体特异性标志蛋白,结果显示(图5)外泌体提取液均表达CD81、CD63蛋白,但提取后的上清不表达这两种外泌体共有标志物,葡萄糖包被纳米磁珠提取血清中的外泌体完全符合外泌体的特征。

[0067] 实施例4

[0068] Western blot检测外泌体的纯度

[0069] 分别采用PEG沉淀法,超速离心法和本发明方法,提取了细胞培养上清及血清中的外泌体,并选择外泌体样品中的常见污染蛋白Calnexin(内质网标记蛋白)进行了Western blot检测。收集不同方法提取的外泌体。加入RIPA裂解液裂解,测定蛋白质浓度,平衡上样量进行12%SDS-PAGE电泳。蛋白分离后将其转移至硝酸纤维素膜上,室温下用含5%脱脂牛奶封闭液封闭处理1h。经1×TBST缓冲液洗脱后,分别加入一抗(Calnexin单克隆抗体),于4℃条件下反应过夜。经再次洗脱后,室温下避光加入荧光标记的二抗反应1h。再用1×TBST缓冲液洗膜,在化学发光成像仪中扫描显像。Western blot检测外泌体样品中的常见污染蛋白Calnexin,结果显示(图6)PEG沉淀法和超速离心法提取的外泌体都表达了Calnexin,但本发明方法提取的外泌体不表达。这说明葡萄糖包被纳米磁珠法捕获的外泌体纯度较高。

[0070] 实施例5

[0071] 透射电镜观察提取的外泌体的损伤情况

[0072] (1) 超速离心提取外泌体:当细胞融合度达到70%~80%时,除去原培养基并用PBS清洗4次,更换10%无外泌体血清配置的DMEM培养基,培养48小时后收集细胞培养上清液约50ml,室温2000g离心20分钟,弃细胞碎片沉淀;取离心上清液,在4℃下10000g,离心30分钟,弃大囊泡沉淀,收取离心上清,在4℃条件下100000×g离心2h,收集底部沉淀用PBS重悬,再次100000×g离心2h,洗涤1次,最后收集沉淀用100u1PBS重悬。

[0073] (2) 透射电镜鉴定:取制备好的样品,按体积比=1:1加入4℃的PBS溶液稀释后滴加于2mm的载样铜网上,于室温静置1min后用滤纸将多余液体轻轻吸去,用3% (w/v) 磷钨酸钠溶液 (pH6.8) 室温负染5分钟,用双蒸水轻轻洗一遍后室温晾干,于透射电镜观察并照相、测量其直径。结果显示,由于超速离心的高离心力,图7中外泌体的膜结构有一定程度的损伤。而图3中糖包被纳米磁珠提取的外泌体膜结构完好。

[0074] 超速离心法需要特殊的超速离心设备,操作复杂耗费大量人力物力,耗时近6小时,糖包被纳米磁珠法则操作简便,耗时仅3小时便可完成外泌体的提取。

[0075] 由以上实施例可以得出,采用本发明提供的捕获纳米磁珠捕获外泌体,与超速离心获得外泌体相比,不仅缩短了捕获时间,得到的外泌体稳定,不损伤囊泡;与沉淀法相比,外泌体的纯度高;与免疫磁珠法相比,无需购买昂贵的修饰材料,降低成本。

[0076] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

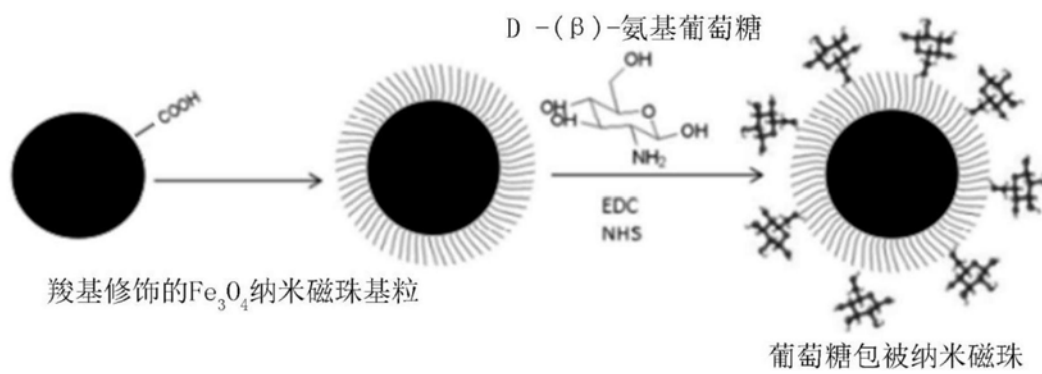


图1

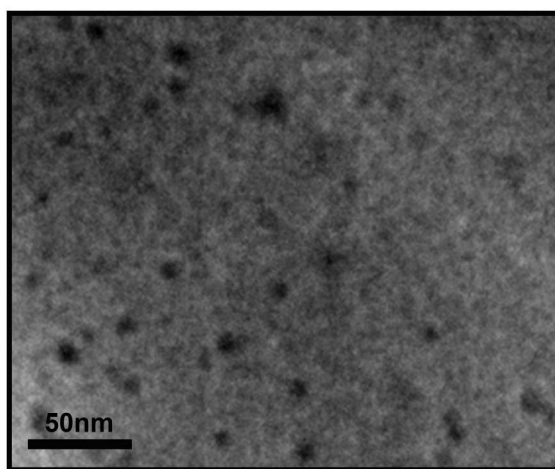


图2

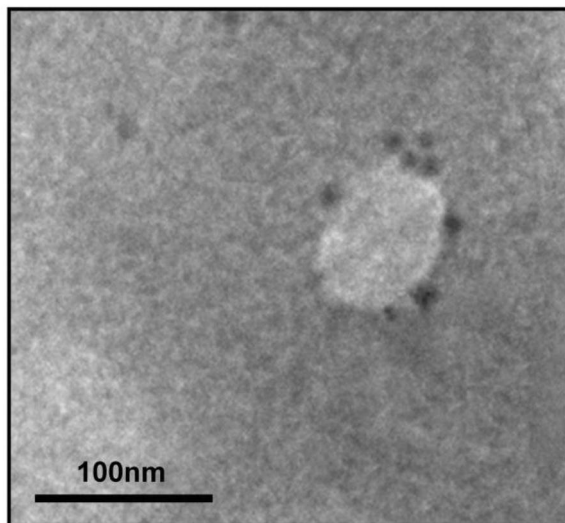


图3

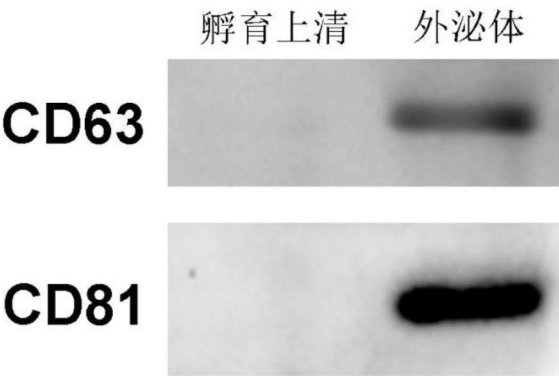


图4

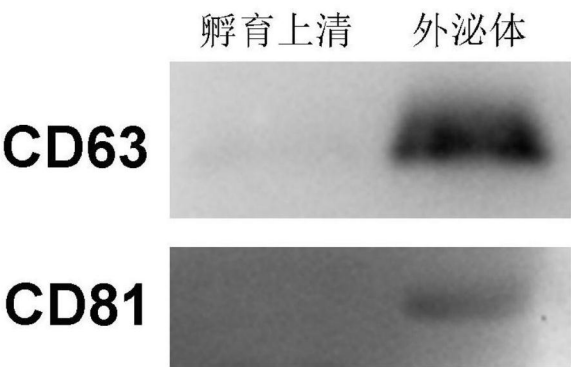


图5

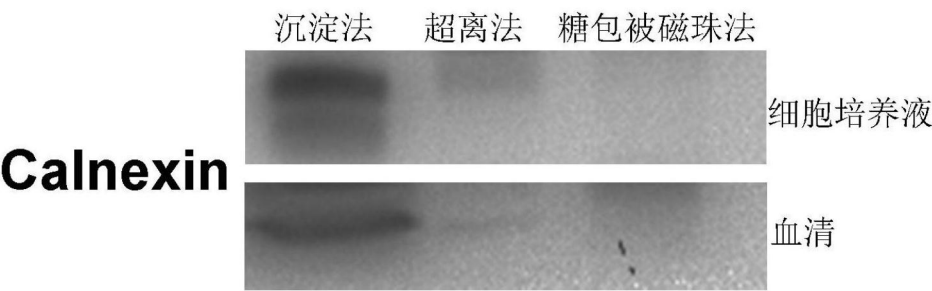


图6

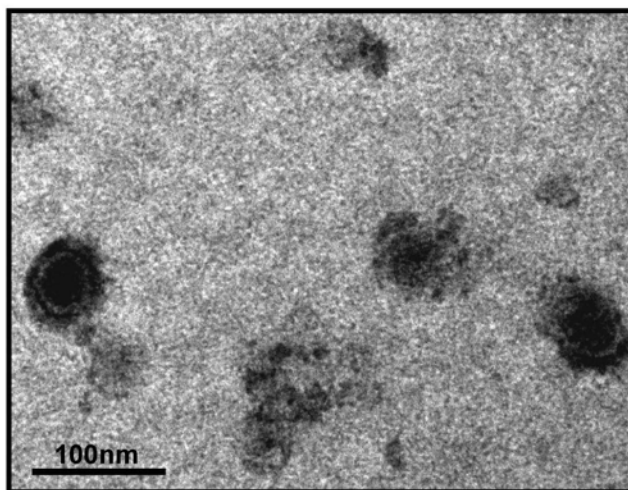


图7

专利名称(译)	一种捕获纳米磁珠、捕获外泌体的方法和应用		
公开(公告)号	CN109738625A	公开(公告)日	2019-05-10
申请号	CN201910008082.7	申请日	2019-01-04
[标]申请(专利权)人(译)	湖南师范大学		
申请(专利权)人(译)	湖南师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖南师范大学		
[标]发明人	陈平 寻成峰 卢明 唐凤 葛丽特 李莎		
发明人	陈平 寻成峰 卢明 唐凤 葛丽特 李莎		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	刘奇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种捕获纳米磁珠、捕获外泌体的方法和应用，属于生物技术领域，所述捕获纳米磁珠将纳米磁珠与D-(β)-氨基葡萄糖缩合偶联后得到。采用本发明提供的捕获纳米磁珠捕获外泌体，与超速离心获得外泌体相比，不仅缩短了捕获时间，得到的外泌体稳定，不损伤囊泡；与沉淀法相比，外泌体的纯度高；与免疫磁珠法相比，无需购买昂贵的修饰材料，降低成本。

