



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112557649 A

(43) 申请公布日 2021.03.26

(21) 申请号 201910909724.0

(22) 申请日 2019.09.25

(71) 申请人 深圳光彩生命工程技术有限公司  
地址 518000 广东省深圳市宝安区新安街  
道67区大仟工业厂区2号厂房11楼

(72) 发明人 丁小梅

(74) 专利代理机构 北京中仟知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11825

代理人 田江飞

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 23/04 (2018.01)

G01N 23/20 (2018.01)

G01N 23/20008 (2018.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种检测外泌体的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测外泌体的方法,包括如下步骤:S1采集外泌体的样本、S2外泌体的预处理、S3外泌体的处理和S4外泌体的检测。该检测外泌体的方法,大大的提高外泌体的处理效果,提高了外泌体的纯度,通过在样本采取后,依次由相对分子质量的超滤膜和磁珠免疫法的配合使用,大大提高了外泌体的处理效果,并且此方法无须复杂的操作和较高的实验要求,降低了检测成本,也提高了对外泌体检测的精准度。

1. 一种检测外泌体的方法,其特征在于:包括如下步骤:

S1、采集外泌体的样本,提取细胞内溶酶体微粒内陷形成的多囊泡体,经多囊泡体外膜与细胞膜融合后释放到胞外基质中,通过离心的方式去除胞外基质中的细胞杂质,得到外泌体和分析液,提取分析液存储在试管内,用于对分析液的检测,再提取外泌体储存在培养基内,用于对外泌体的检测;

S2、外泌体的预处理,通过利用不同截留的相对分子质量(MWCO)的超滤膜对培养基内的外泌体进行选择分离,从而获得预处理后的外泌体;

S3、外泌体的处理,将分离后的外泌体的表面,用包被抗标记物抗体的磁珠与外泌体囊泡孵育后结合,即可将外泌体吸附并分离出来,从而去除外泌体内的杂质,再取出上清后,进行超声破碎处理;

S4、外泌体的检测,超声破碎后的外泌体,首先与核酸适体进行特异性结合,再将核酸适体的嵌合体修饰到外泌体表面,而嵌合体部分则作为开关引发两条单链反应,获得纳米组装体,再由动态光散射对纳米组装体上的靶细胞所分泌的外泌体表面进行原位组装,再对形成原位组装的外泌体配合透射电子显微镜进行检测,达到外泌体的检测效果。

2. 根据权利要求1所述的一种检测外泌体的方法,其特征在于:步骤S1中,所述在外泌体储存在培养基内之前,通过电镜对外泌体进行观察。

3. 根据权利要求1所述的一种检测外泌体的方法,其特征在于:步骤S3中,所述离心去除胞外基质中细胞杂质的离心时间为10-12min,去除大直径多囊泡体的离心时间为35-45min,并且离心旋转为8000r/min-12000r/min。

4. 根据权利要求1所述的一种检测外泌体的方法,其特征在于:步骤S3中,所述上清与含1%脱脂奶的PBS按照体积比1:29进行稀释,然后进行超声破碎,所述超声破碎条件为间隔5s开关一次,至少60循环。

5. 根据权利要求1所述的一种检测外泌体的方法,其特征在于:步骤S4中,所述核酸适体的嵌合体在温度为10-15℃的环境下修饰到外泌体表面。

## 一种检测外泌体的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及外泌体技术领域,更具体地说,尤其涉及一种检测外泌体的方法。

### 背景技术

[0002] 外泌体是指包含了复杂RNA和蛋白质的小膜泡(30-150nm),现今,其特指直径在40-100nm的盘状囊泡,多种细胞在正常及病理状态下均可分泌外泌体,其主要来源于细胞内溶酶体微粒内陷形成的多囊泡体,经多囊泡体外膜与细胞膜融合后释放到胞外基质中。

[0003] 由于外泌体为纳米级囊泡结构,现有技术大部分采用外泌体提取试剂盒对其进行脱水处理后,高速离心得到,虽然这种方式较为成熟,但会造成提取的外泌体纯度不高,影响了外泌体的检测精准度,因此,需要一种检测外泌体的方法。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种检测外泌体的方法,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0006] 一种检测外泌体的方法,包括如下步骤:

[0007] S1、采集外泌体的样本,提取细胞内溶酶体微粒内陷形成的多囊泡体,经多囊泡体外膜与细胞膜融合后释放到胞外基质中,通过离心的方式去除胞外基质中的细胞杂质,得到外泌体和分析液,提取分析液存储在试管内,用于对分析液的检测,再提取外泌体储存在培养基内,用于对外泌体的检测;

[0008] S2、外泌体的预处理,通过利用不同截留的相对分子质量(MWCO)的超滤膜对培养基内的外泌体进行选择分离,从而获得预处理后的外泌体;

[0009] S3、外泌体的处理,将分离后的外泌体的表面,用包被抗标记物抗体的磁珠与外泌体囊泡孵育后结合,即可将外泌体吸附并分离出来,从而去除外泌体内的杂质,再取出上清后,进行超声破碎处理;

[0010] S4、外泌体的检测,超声破碎后的外泌体,首先与核酸适体进行特异性结合,再将核酸适体的嵌合体修饰到外泌体表面,而嵌合体部分则作为开关引发两条单链反应,获得纳米组装体,再由动态光散射对纳米组装体上的靶细胞所分泌的外泌体表面进行原位组装,再对形成原位组装的外泌体配合透射电子显微镜进行检测,达到外泌体的检测效果。

[0011] 优选的,步骤S1中,所述在外泌体储存在培养基内之前,通过电镜对外泌体进行观察。

[0012] 优选的,步骤S3中,所述离心去除胞外基质中细胞杂质的离心时间为10-12min,去除大直径多囊泡体的离心时间为35-45min,并且离心旋转为8000r/min-12000r/min。

[0013] 优选的,步骤S3中,所述上清与含1%脱脂奶的PBS按照体积比1:29进行稀释,然后进行超声破碎,所述超声破碎条件为间隔5s开关一次,至少60循环。

[0014] 优选的,步骤S4中,所述核酸适体的嵌合体在温度为10-15℃的环境下修饰到外泌

体表面。

[0015] 本发明的技术效果和优点:该检测外泌体的方法,大大的提高外泌体的处理效果,提高了外泌体的纯度,通过在样本采取后,依次由相对分子质量的超滤膜和磁珠免疫法的配合使用,大大提高了外泌体的处理效果,并且此方法无须复杂的操作和较高的实验要求,降低了检测成本,也提高了对外泌体检测的精准度。

### 具体实施方式

[0016] 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做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。

[0017] 一种检测外泌体的方法,包括如下步骤:

[0018] S1、采集外泌体的样本,提取细胞内溶酶体微粒内陷形成的多囊泡体,经多囊泡体外膜与细胞膜融合后释放到胞外基质中,通过离心的方式去除胞外基质中的细胞杂质,得到外泌体和分析液,提取分析液存储在试管内,用于对分析液的检测,再提取外泌体储存在培养基内,用于对外泌体的检测;

[0019] S2、外泌体的预处理,通过利用不同截留的相对分子质量(MWCO)的超滤膜对培养基内的外泌体进行选择分离,从而获得预处理后的外泌体;

[0020] S3、外泌体的处理,将分离后的外泌体的表面,用包被抗标记物抗体的磁珠与外泌体囊泡孵育后结合,即可将外泌体吸附并分离出来,从而去除外泌体内的杂质,再取出上清后,进行超声破碎处理;

[0021] S4、外泌体的检测,超声破碎后的外泌体,首先与核酸适体进行特异性结合,再将核酸适体的嵌合体修饰到外泌体表面,而嵌合体部分则作为开关引发两条单链反应,获得纳米组装体,再由动态光散射对纳米组装体上的靶细胞所分泌的外泌体表面进行原位组装,再对形成原位组装的外泌体配合透射电子显微镜进行检测,达到外泌体的检测效果。

[0022] 具体的,步骤S1中,所述在外泌体储存在培养基内之前,通过电镜对外泌体进行观察。

[0023] 具体的,步骤S3中,所述离心去除胞外基质中细胞杂质的离心时间为 10-12min,去除大直径多囊泡体的离心时间为35-45min,并且离心旋转为 8000r/min-12000r/min。

[0024] 具体的,步骤S3中,所述上清与含1%脱脂奶的PBS按照体积比1:29进行稀释,然后进行超声破碎,所述超声破碎条件为间隔5s开关一次,至少60 循环。

[0025] 具体的,步骤S4中,所述核酸适体的嵌合体在温度为10-15℃的环境下修饰到外泌体表面。

[0026] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:本发明与常规检测外泌体的方法相比,大大的提高外泌体的处理效果,提高了外泌体的纯度,通过在样本采取后,依次由相对分子质量的超滤膜和磁珠免疫法的配合使用,大大提高了外泌体的处理效果,并且此方法无须复杂的操作和较高的实验要求,降低了检测成本,也提高了对外泌体检测的精准度。

[0027] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换,

凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。