

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ выделения микровезикул из растений семейства амарантовых.

Изобретение относится к способам выделения биологически активных веществ из растительного сырья, в частности, к способам получения
5 микровезикул (диаметром 50-1200 нм) из растений семейства амарантовых. Заявленный способ может быть использован в медицинской, косметической и пищевой промышленности.

Из уровня техники известен метод выделения микровезикул из культуральной среды, включающий центрифугирование, последовательное
10 ультрацентрифугирование, растворение полученного осадка в ФСБ и повторное центрифугирование см. стр. 25, первые два абзаца по ссылке [https://www.researchgate.net/publication/323269152_Isolation_of_extracellular_micro-](https://www.researchgate.net/publication/323269152_Isolation_of_extracellular_micro-vesicles_from_cell_culture_medium_Comparative_evaluation_of_methods)
[vesicles from cell culture medium Comparative evaluation of methods.](https://www.researchgate.net/publication/323269152_Isolation_of_extracellular_micro-vesicles_from_cell_culture_medium_Comparative_evaluation_of_methods)

Основным недостатком метода, перечисленного под пунктом 1 на
15 стр.25, является недостаточная эффективность, т.к. известный метод не позволяет отделить по размеру микровезикулы от остальных частиц, находящихся в полученном осадке. Другим недостатком является использование в качестве материала-источника выделения экзосом
20 культуральной клеточной среды, получение которой требует затрат определённых реагентов (питательная среда, сыворотка, L- глутамин, пируват натрия, антибиотики, растворы для отмывки типа раствора Хэнкса), заказ и получение зарегистрированных клеточных линий, ведение полученных клеточных линий или получение клеточной культуры с
25 последующей необходимостью описания данной клеточной культуры. Перечисленные этапы требуют определённых материальных и временных затрат, что делает данный метод получения микровезикул трудоёмким и затратным.

Техническим результатом предлагаемого нами способа выделения микровезикул является возможность выделения микровезикул из растений семейства амарантовых.

Вышеприведенный технический результат достигается при
5 использовании способа выделения микровезикул, при котором осуществляют сбор растений семейства амарантовых, которые измельчают до получения гомогенизированной смеси, из которой затем отделяют жидкую фазу посредством фильтра грубой очистки, которую последовательно центрифугируют в течение 30 минут при 3000 g и в
10 течение 60 минут при 10 000 g соответственно для избавления полученной смеси от крупных частиц – клеточных конгломератов и единичных клеток, затем проводят ультрацентрифугирование отобранного супернатанта в течение 90 минут при 150 000 g, затем полученный осадок суспендируют в натрий-фосфатном буфере в соотношении 1:10 и повторно
15 ультрацентрифугируют в течение 90 минут при 150 000 g. Этапы ультрацентрифугирования необходимы для избавления смеси от апоптотических телец, белковых конгломератов и белков >30 kDa. Далее полученный осадок повторно суспендируют в натрий-фосфатном буфере в соотношении 1:10, после чего проводят фильтрацию посредством фильтра
20 с диаметром пор 1,2 μ m, что позволяет отделить микровезикулы искомого спектра – до 1200 нм – от остальных частиц, находящихся в полученном осадке. Кроме того, нами экспериментально установлено, что при такой последовательности операций и режимах, заявленный способ позволяет максимально эффективно выделить микровезикулы из растений семейства
25 амарантовых.

Пример выполнения заявленного способа:

В автоматический измельчитель помещают 10 г листьев, цветов и
корней (возможно использовать любые пропорции – не влияет на
получение заявленного технического результата, т.к. микровезикулы
30 содержатся в различных частях растений примерно в равных количествах)

растений *Amaranthus blitoides* S.Wats. измельчают, до получения
гомогенной (однородной) смеси. Затем отбирают жидкую фазу
посредством фильтрации через сетку с диаметром пор пор 1-2 мм. Далее
проводят последовательное центрифугирование в течение 30 минут при
5 3000 g и в течение 60 минут при 10 000 g соответственно. Затем
полученный осадок суспендируют в натрий-фосфатном буфере в
соотношении 1:10 и повторно ультрацентрифугируют в течение 90 минут
при 150 000 g, далее полученный осадок повторно суспендируют в натрий-
фосфатном буфере в соотношении 1:10, после чего проводят фильтрацию
10 посредством фильтра с диаметром пор 1,2 μ м.

Затем 500 мкл полученного раствора исследовали методом фотонной
корреляционной спектроскопии (Nanophox Sympatec GmbH, Германия),
где обнаружили спектры в районе 50-1200 нм, что свидетельствует о
наличии в растворе микровезикул заявленного спектра.

15

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ выделения микровезикул, при котором осуществляют сбор растений семейства амарантовых, которые измельчают до получения гомогенизированной смеси, из которой затем отделяют жидкую фазу
5 посредством фильтра грубой очистки, которую последовательно центрифугируют в течение 30 минут при 3000 g и в течение 60 минут при 10 000 g соответственно, затем проводят ультрацентрифугирование отобранного супернатанта в течение 90 минут при 150 000 g, затем полученный осадок суспендируют в натрий-фосфатном буфере в
10 соотношении 1:10 и повторно ультрацентрифугируют в течение 90 минут при 150 000 g, далее полученный осадок повторно суспендируют в натрий-фосфатном буфере в соотношении 1:10, после чего проводят фильтрацию посредством фильтра с диаметром пор 1,2 мкм.

15