



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110702589 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201910961754.6

G01N 33/541(2006.01)

(22)申请日 2019.10.11

(71)申请人 南京吉鹏博生物科技有限公司

地址 210028 江苏省南京市栖霞区迈皋桥
创业园科技研发基地寅春路18号-
Q1478

(72)发明人 金芳芳 王延博 徐学博 陈张朋
薛姜飞

(74)专利代理机构 北京权智天下知识产权代理
事务所(普通合伙) 11638

代理人 王新爱

(51)Int.Cl.

G01N 15/14(2006.01)

G01N 23/2251(2018.01)

G01N 33/537(2006.01)

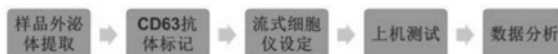
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54)发明名称

一种流式细胞仪检测外泌体的方法

(57)摘要

本发明提供一种流式细胞仪检测外泌体的方法,包括如下步骤:(1)收集样品,提取外泌体;(2)抗体孵育:将提取的外泌体用含2%BSA的PBS溶液溶解,先后进行一抗和二抗孵育,得到CD63标记的外泌体检测液;(3)流式细胞仪的参数设置:正常运行流式细胞仪,进行参数设置;(4)上机检测:将所述CD63标记的外泌体检测液加入PBS溶液重悬,上机检测;(5)利用流式细胞仪分析软件对数据进行分析,得到外泌体的定量检测结果。本发明属于生物检测技术领域,可有效对血清、血浆和尿液等不同样品中的外泌体进行定量分析,检测结果特异性强,且操作过程方便、快捷,重复性好。



1. 一种流式细胞仪检测外泌体的方法,其特征在于:包括如下具体步骤:
 - (1) 收集样品,提取外泌体;
 - (2) 抗体孵育:将提取的外泌体用含2%BSA的PBS溶液溶解,先后进行一抗和二抗孵育,得到CD63标记的外泌体检测液;
 - (3) 流式细胞仪的参数设置:正常运行流式细胞仪,进行参数设置;
 - (4) 上机检测:将所述CD63标记的外泌体检测液加入PBS溶液重悬,上机检测;
 - (5) 利用流式细胞仪分析软件对数据进行分析,得到外泌体的定量检测结果。
2. 如权利要求1所述的流式细胞仪检测外泌体的方法,其特征在于:所述样品为血清、血浆、尿液或细胞培养液,使用试剂盒进行外泌体的提取。
3. 如权利要求1所述的流式细胞仪检测外泌体的方法,其特征在于:所述一抗和二抗孵育的步骤具体包括:1) 一抗孵育:加入anti-CD63抗体,混匀,孵育25~35min;2) 荧光二抗孵育:一抗孵育后加入荧光二抗,混匀,室温避光孵育25~35min。
4. 如权利要求1所述的流式细胞仪检测外泌体的方法,其特征在于:所述流式细胞仪为美国Beckman Coulter公司的CytoFLEX S型号。
5. 如权利要求1所述的流式细胞仪检测外泌体的方法,其特征在于:所述参数设置的步骤具体包括:1) 建立FSC/VSSC散点图,圈定500nm以下的微颗粒分布区域,设定门;2) 建立CD63参数散点图,设定门。
6. 如权利要求1所述的流式细胞仪检测外泌体的方法,其特征在于:所述上机检测的上机速度设定为中速,使上机样品的机器读取速度为4000-8000个/秒。

一种流式细胞仪检测外泌体的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,尤其涉及一种流式细胞仪检测外泌体的方法。

背景技术

[0002] 外泌体(exosome)是直径约为30-150nm的微小囊泡。外泌体天然存在于各种体液中,包括血液、唾液、尿液和母乳,是活细胞分泌的来源于晚期核内体(也称为多囊泡体)的膜性囊泡。

[0003] 目前针对外泌体的研究主要集中在:(1)外泌体用于疾病的早期诊断;在不同疾病状态下,如肿瘤、糖尿病和炎症等疾病发生时,细胞分泌的外泌体会发生显著变化,通过检测各种体液中的外泌体数量、外泌体表面蛋白或内含物的变化情况达到早期无创诊断疾病的目的;(2)外泌体作为载体在体内进行信号交流;外泌体本身会包裹大量的蛋白或RNA分子,细胞一方面分泌外泌体,另外一方面也会摄取其他细胞分泌的外泌体,这样不同细胞就通过外泌体进行了信息交流。因此,现在的研究主要集中于探究存在于体液中的外泌体是如何介导细胞间和组织间进行信息交流,进而导致某种生理或病理现象的发生。

[0004] 然而,外泌体的研究现如今面临着较大的困境,因为无论针对哪个方面的研究都需要一种精准高效的外泌体检测定量方法,而现如今外泌体的检测技术主要包括:(1)扫描电子显微镜观察形态;该技术对样品的预处理和制备上面要求较高,样品的准备阶段比较复杂,不适合对外泌体进行大量快速的检测,而且由于外泌体经过了复杂的预处理和制备过程,无法准确的进行外泌体浓度的测量;(2)动态光散射技术;由于动态光散射技术是测量光强的波动数据,所以大颗粒的光强波动信号会掩盖较小颗粒的光强波动信号,所以动态光散射不适合大小不一的复杂外泌体样本的测量,只适合通过色谱法制备的大小均一的外泌体的尺寸测量,并且无法测量样品中外泌体的浓度。(3)Western Blot技术:操作较为繁琐,定量不准确。

[0005] 中国专利申请CN 106841613A公开了一种检测外泌体的方法,原理是基于磁微粒化学发光免疫检测机制,包括如下步骤:采集生物样本,收集外泌体分析液,进行蛋白定量;采用偶联有抗外泌体表面标志物单克隆抗体的磁性微粒等组成的检测体系测定;采用偶联有抗外泌体表面标志物单克隆抗体和酶标记抗癌胚抗原CEA单克隆抗体等组成的泌体CEA检测体系测定;计算外泌体CEA阴性亚群和外泌体CEA阳性亚群的比例;基于上述检测结果,建立生物样本的外泌体分布模型。该检测方法虽可用于不同生物样本中外泌体的检测,但分析步骤复杂,不利于实现大量、快速的检测。

[0006] 流式细胞术工作原理是在细胞分子水平上通过单克隆抗体对单个细胞或其他生物粒子进行多参数、快速的定量分析。流式细胞术可以高速分析上万个颗粒,并能同时从一个颗粒中测得多个参数,具有速度快、精度高、准确性好的优点,是当代最先进的细胞或微颗粒定量分析技术之一。传统流式细胞仪针对的样本主要是细胞,散射光的检测极限通常是300-500nm,而大多数细胞外囊泡的直径都在300nm以下。随着科技的发展,Beckman Coulter公司开发了 CytoFLEX S流式细胞仪型号,该型号的机器经过调试后可适用于检测

低于100nm的微颗粒,但尚未被开发用于外泌体的定量检测。

[0007] 因此,现有技术难以对外泌体进行大量、快速、精确地定性和定量分析。

发明内容

[0008] 为解决现有技术中存在的问题,发明人在对CytoFLEX S流式细胞仪性能和参数设置进行充分研究的基础上,通过使用筛选的特异性蛋白表面标志物CD63进行标记,进而提供了一种流式细胞仪定量检测外泌体的方法。该方法可有效对血清、血浆和尿液等不同样品中的外泌体进行定量分析,检测结果特异性强,且操作过程方便、快捷,重复性好。

[0009] 为了实现本发明的目的,本发明采用以下技术方案。

[0010] 一种流式细胞仪检测外泌体的方法,包括如下具体步骤:

[0011] (1) 收集样品,提取外泌体;

[0012] (2) 抗体孵育:将提取的外泌体用含2%BSA的PBS溶液溶解,先后进行一抗和二抗孵育,得到CD63标记的外泌体检测液;

[0013] (3) 流式细胞仪的参数设置:正常运行流式细胞仪,进行参数设置;

[0014] (4) 上机检测:将所述CD63标记的外泌体检测液加入PBS溶液重悬,上机检测;

[0015] (5) 利用流式细胞仪分析软件对数据进行分析,得到外泌体的定量检测结果。

[0016] 需要说明的是,本发明的目的不是直接获得疾病诊断结果或健康状况,而只是获得外泌体的检测结果(中间结果),利用本发明对外泌体进行准确定量后可以检测不同状态下外泌体含量的差异,通过设定相应的阈值可望用于后续诊断工作,因此该发明及其相关的检测结果对后续的进一步诊断及信息介导等相关基础研究具有重要价值。

[0017] 优选地,所述样品为血清、血浆、尿液或细胞培养液,使用试剂盒进行外泌体的提取。收集血液样本,分离血清和血浆(分离血清时使用促凝管,分离血浆时使用抗凝管,分别室温3000rpm离心10min);收集尿液样本时,使用离心管3000rpm离心10min后收集上清;收集细胞培养液时,3000rpm离心10min后收集上清。

[0018] 外泌体的提取,可使用现有的提取方法或试剂盒提取,优选使用Life Technologies (invitrogen)公司的试剂盒-Total Exosome Isolation Reagent,针对血清、血浆、尿液和细胞培养液的不同样品,试剂盒货号分别为:4478360、4484450、4484452、4478359。根据试剂盒说明书分别提取血清、血浆、尿液和细胞培养液中的外泌体,具体操作如下:取100uL血清、血浆、尿液或细胞培养液样品,2000g离心30min,以去除细胞碎片;将上清转移至新的离心管中,加入20uL(1/5样品体积)Total Exosome Isolation Reagent,在涡旋振荡器上充分混匀;将混匀后的样品在4℃冰箱孵育30min,孵育完成后,10000g室温离心10min,弃上清,底部沉淀即为外泌体。

[0019] 优选地,所述一抗和二抗孵育的步骤具体包括:1) 一抗孵育:加入anti-CD63抗体,混匀,孵育25~35min;2) 荧光二抗孵育:一抗孵育后加入荧光二抗,混匀,室温避光孵育 25~35min。

[0020] 优选地,所述流式细胞仪为美国Beckman Coulter公司的CytoFLEX S型号。

[0021] 优选地,所述参数设置的步骤具体包括:1) 建立FSC/VSSC散点图,圈定500nm以下的微颗粒分布区域,设定门;2) 建立CD63参数散点图,设定门。按正常程序打开流式细胞仪,建立FSC/VSSC散点图,使用美国Beckman Coulter公司的Megamix-Plus FSC beads,分别用

100nm、200nm、300nm和500nm的微球,调整gain值,圈定500nm以下的微颗粒分布区域,设定门,同时以PBS溶液为阴参,去除PBS溶液中本身颗粒的干扰;同样的电压条件下,样本检测管分布于门内的包含囊泡微颗粒;建立CD63参数散点图,设定门,门内CD63 阳性的囊泡微颗粒,即为外泌体。

[0022] 优选地,所述上机检测的上机速度设定为中速,使上机样品的机器读取速度为4000-8000 个/秒。

[0023] 优选地,利用流式细胞仪分析软件CytExpert对数据进行分析,得到外泌体的定量检测结果。

[0024] 与现有技术相比,本发明的有益效果如下:

[0025] 1) 本发明利用新型流式细胞仪(CytoFLEX S型号)分辨率高、高通量和高灵敏度的特点,经参数调节可检测直径100nm以下的微颗粒,进一步结合外泌体跨膜蛋白CD63这一特有的标志物,建立了一种流式细胞仪用于外泌体检测的方法,该方法可用于血清、血浆、尿液和细胞培养液中的外泌体定量检测,具有高灵敏度和高普适性的特点。

[0026] 2) 本发明的检测方法具有方便快捷、易操作、低成本、重复性好等优点,具体表现为检测时长小于2h,检测样本所需体积小于100uL,单个样本检测成本小于30元,检测结果的准确性和特异性好。

附图说明

[0027] 图1是流式细胞仪检测外泌体的操作流程图。

[0028] 图2是流式细胞仪检测外泌体的检测原理图。

[0029] 图3是外泌体扫描电子显微镜图片。

[0030] 图4是流式细胞仪参数设置的示意图。

[0031] 图5是nanosight鉴定分离后的外泌体纯度图。

[0032] 图6是正常人和乳腺癌病人血清、血浆单位体积内外泌体含量统计图。

[0033] 图7是正常人和肾炎病人尿液中单位体积内外泌体含量统计图。

[0034] 图8是293T细胞(人肾胚细胞)和MCF-7(人乳腺癌细胞)细胞培养液中单位体积内外泌体含量统计图。

具体实施方式

[0035] 下面结合附图和实施例对本发明做进一步详细说明。

[0036] 本发明中,所涉及的试剂或试剂盒均为常规市售产品。

[0037] 实施例一流式细胞仪检测外泌体的方法

[0038] 本发明提供的流式细胞仪检测外泌体的方法,包括如下具体步骤:

[0039] (1) 收集样品,提取外泌体;

[0040] (2) 抗体孵育:将提取的外泌体用含2%BSA的PBS溶液溶解,先后进行一抗和二抗孵育,得到CD63标记的外泌体检测液;

[0041] (3) 流式细胞仪的参数设置:正常运行流式细胞仪,进行参数设置;

[0042] (4) 上机检测:将所述CD63标记的外泌体检测液加入PBS溶液重悬,上机检测;

[0043] (5) 利用流式细胞仪分析软件对数据进行分析,得到外泌体的定量检测结果。

[0044] 本发明提供的方法操作流程图如图1所示,检测原理图如图2所示。

[0045] 实施例二正常人和乳腺癌病人血清和血浆中外泌体含量检测

[0046] (1) 收集样品,提取外泌体:收集正常人和乳腺癌病人血液样品各10例,分离血清和血浆(分离血清时使用促凝管,分离血浆时使用抗凝管,分别室温3000rpm离心10min);使用Life Technologies (invitrogen) 公司的试剂盒-Total Exosome Isolation Reagent,针对血清样品和血浆样品的试剂盒货号分别为:4478360和4484450,根据试剂盒说明书分别提取10例正常人和10例乳腺癌病人的血清、血浆中外泌体;具体操作如下:取100uL血清和血浆,2000g 离心30min,以去除细胞碎片;将上清转移至新的离心管中,加入20uL Total Exosome Isolation Reagent,在涡旋振荡器上充分混匀;将混匀后的样品在4℃冰箱孵育30min;孵育完成后,10000g室温离心10min;弃上清,底部沉淀即为外泌体;外泌体的扫描电子显微镜图如3图所示;

[0047] (2) 抗体孵育:分别将步骤(1)提取得到的外泌体用100uL含2%BSA的PBS溶解,然后加入2uL anti-CD63抗体(Santa Cruz Biotech公司,货号为SC-5275),混匀,室温孵育30min;然后往样品中加入1uL Alexa Fluor 594goat anti-mouse荧光二抗(Life Technologies公司,货号为A11005)混匀,室温避光孵育30min,分别得到CD63标记的外泌体检测液;

[0048] (3) 流式细胞仪的参数设置:按正常程序打开流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司的 CytoFLEX S型号),建立FSC/VSSC散点图,使用美国Beckman Coulter公司的Megamix-Plus FSC beads,分别用100nm、200nm、300nm和500nm的微球,调整gain值,圈定500nm以下的微颗粒分布区域,设定门;建立CD63参数散点图,设定门,门内的为CD63阳性的囊泡微颗粒,即为待测目标外泌体;流式细胞仪参数设置的示意图如图4所示,nanosight鉴定分离后的外泌体纯度图如图5所示;

[0049] (4) 上机检测:分别将步骤(2)得到的CD63标记的外泌体检测液加入1000uL PBS溶液重悬,上机检测;上机检测时,上机速度设定为中速,即流速为30uL/min,外泌体样品稀释最佳浓度是保证机器读取速度为4000-8000个/秒。

[0050] (5) 利用流式细胞仪分析软件CytExpert对数据进行分析,分析后可得到10例正常人和10例乳腺癌病人100uL血清、血浆样品中外泌体的数量,结果如图6所示。

[0051] 实施例三正常人和肾炎病人尿液中单位体积内外泌体含量检测

[0052] (1) 收集样品,提取外泌体:收集正常人和肾炎病人尿液样品各10例;使用Life Technologies (invitrogen) 公司的试剂盒-Total Exosome Isolation Reagent(货号为:4484452),根据试剂盒说明书分别提取10例正常人和10例肾炎病人尿液样品中外泌体;具体操作如下:取100uL尿液,2000g离心30min,以去除细胞碎片;将上清转移至新的离心管中,加入100uL Total Exosome Isolation Reagent,在涡旋振荡器上充分混匀;将混匀后的样品在4℃冰箱孵育30min;孵育完成后,10000g室温离心20min;弃上清,底部沉淀即为外泌体;

[0053] (2) 抗体孵育:分别将步骤(1)提取得到的外泌体用100uL含2%BSA的PBS溶解,然后加入加入2uL anti-CD63抗体(Santa Cruz Biotech公司,货号为SC-5275),混匀,室温孵育30min;然后往样品中加入1uL Alexa Fluor 594goat anti-mouse荧光二抗(Life Technologies 公司,货号为A11005)混匀,室温避光孵育30min;

[0054] (3) 流式细胞仪的参数设置:按正常程序打开流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司的 CytoFLEX S型号),建立FSC/VSSC散点图,使用美国Beckman Coulter公司的Megamix-Plus FSC beads,分别用100nm、200nm、300nm和500nm的微球,调整gain值,圈定500nm以下的微颗粒分布区域,设定门;建立CD63参数散点图,设定门,门内的为CD63阳性的囊泡微颗粒,即为待测目标外泌体;

[0055] (4) 上机检测:分别将步骤(2)得到的CD63标记的外泌体检测液用500uL PBS重悬,上机检测;上机检测时,上机速度设定为中速,外泌体样品稀释最佳浓度是保证机器读取速度为10000个/秒;

[0056] (5) 利用流式细胞仪分析软件CytExpert对数据进行分析,分析后可得到10例正常人和10例肾炎病人尿液100uL体积样品中外泌体的数量,结果如图7所示。

[0057] 实施例四人肾胚细胞和人乳腺癌细胞细胞培养液中单位体积内外泌体含量检测

[0058] (1) 收集样品,提取外泌体:体外培养293T细胞和MCF-7细胞,至密度为70%时加入新鲜培养基,持续培养48小时后收集两种细胞培养液,3000rpm离心10分钟;使用Life Technologies (invitrogen)公司的试剂盒-Total Exosome Isolation Reagent(货号为:4478359),根据试剂盒说明书分别提取293T细胞和MCF-7细胞细胞培养上清样品中外泌体;具体操作如下:取100uL细胞培养基,2000g离心30min,以去除细胞碎片;将上清转移至新的离心管中,加入50uL Total Exosome Isolation Reagent,在涡旋振荡器上充分混匀;将混匀后的样品在4℃冰箱孵育30min;孵育完成后,10000g室温离心20min;弃上清,底部沉淀即为外泌体;

[0059] (2) 抗体孵育:分别将步骤(1)提取得到的外泌体用100uL含2%BSA的PBS溶解,然后加入加入2uL anti-CD63抗体(Santa Cruz Biotech公司,货号为SC-5275),混匀,室温孵育30min;然后往样品中加入1uL Alexa Fluor 594goat anti-mouse荧光二抗(Life Technologies公司,货号为A11005)混匀,室温避光孵育30min;

[0060] (4) 机器调试参数设置:按正常程序打开流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司的 CytoFLEX S型号),建立FSC/VSSC散点图,使用美国Beckman Coulter公司的Megamix-Plus FSC beads,分别用100nm、200nm、300nm、和500nm的微球,调整gain值,圈定500nm以下的微颗粒分布区域,设定门;建立CD63参数散点图,设定门,门内的为CD63阳性的囊泡微颗粒,即为待测目标外泌体;

[0061] (5) 上机检测:分别将步骤(2)得到的CD63标记的外泌体检测液用500uL PBS重悬,上机检测;上机检测时,上机速度设定为中速,外泌体样品稀释最佳浓度是保证机器读取速度为10000个/秒;

[0062] (6) 利用流式细胞仪分析软件CytExpert对数据进行分析,分析后可得到293T细胞和MCF-7细胞细胞培养上清100uL体积样品中外泌体的数量,结果如图8所示。

[0063] 以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换,都应当视为属于本发明的保护范围。

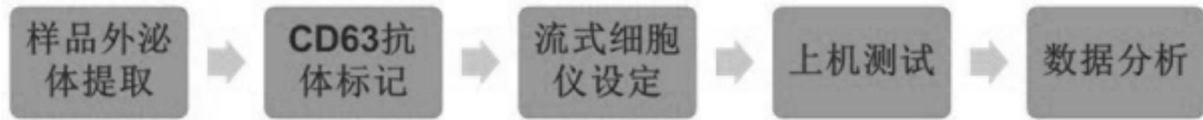


图1



图2

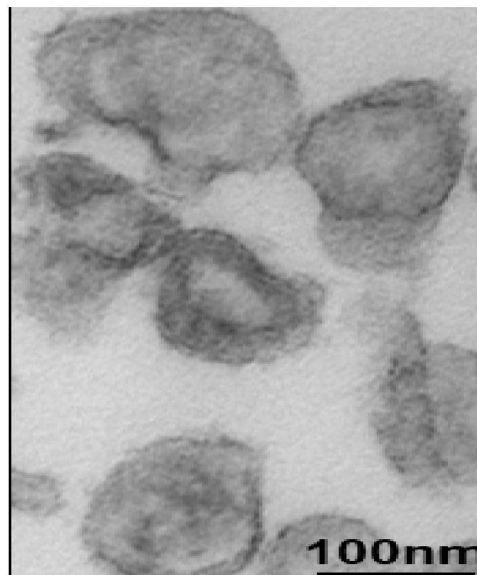
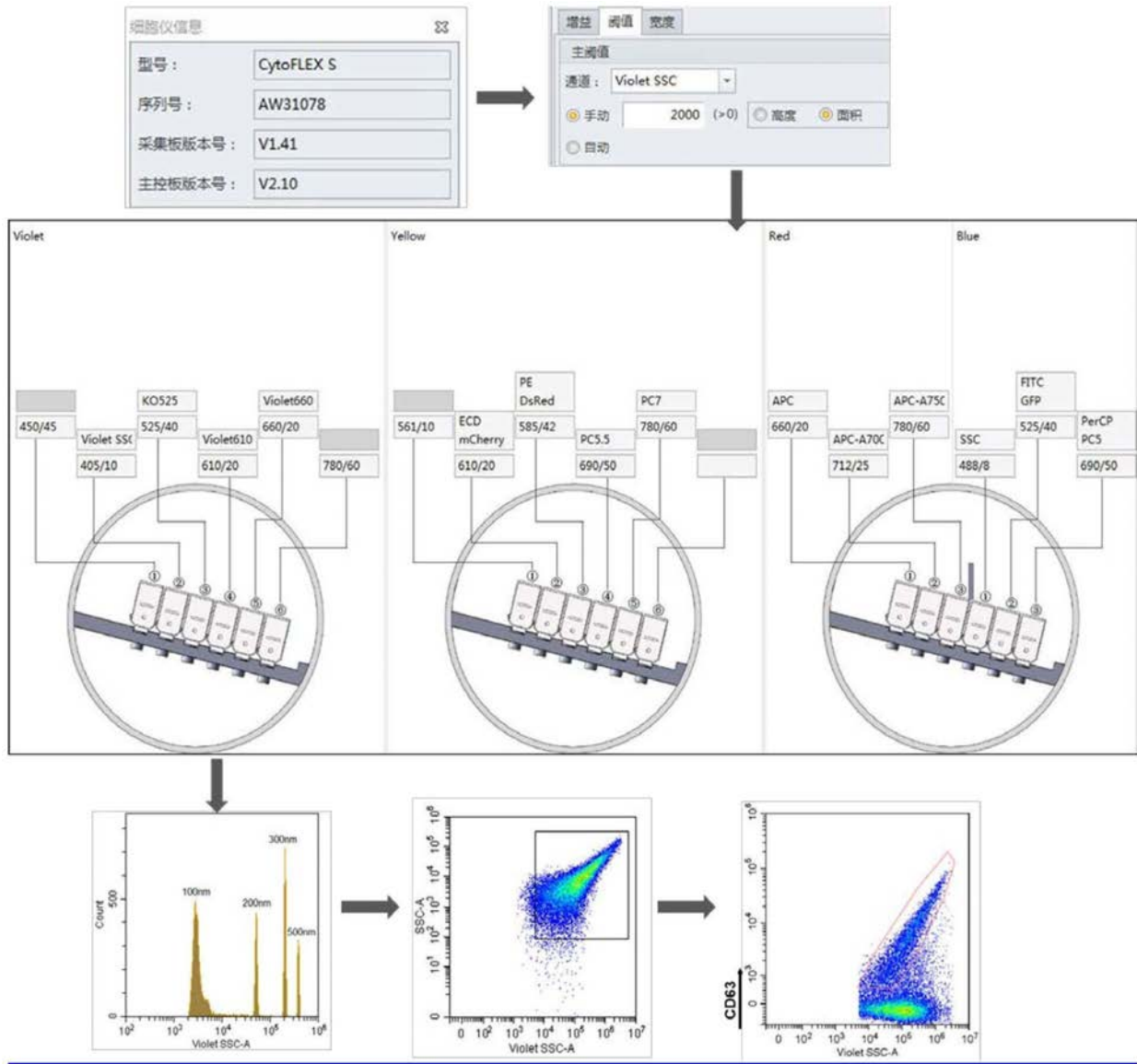


图3



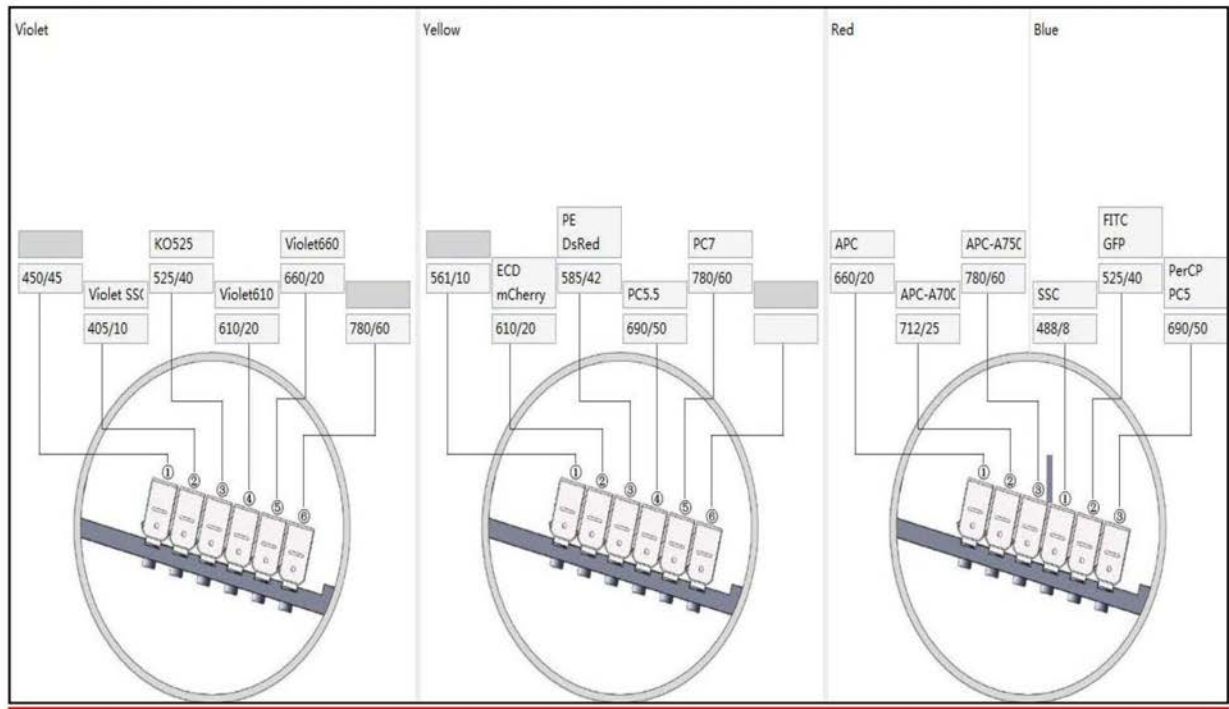


图4

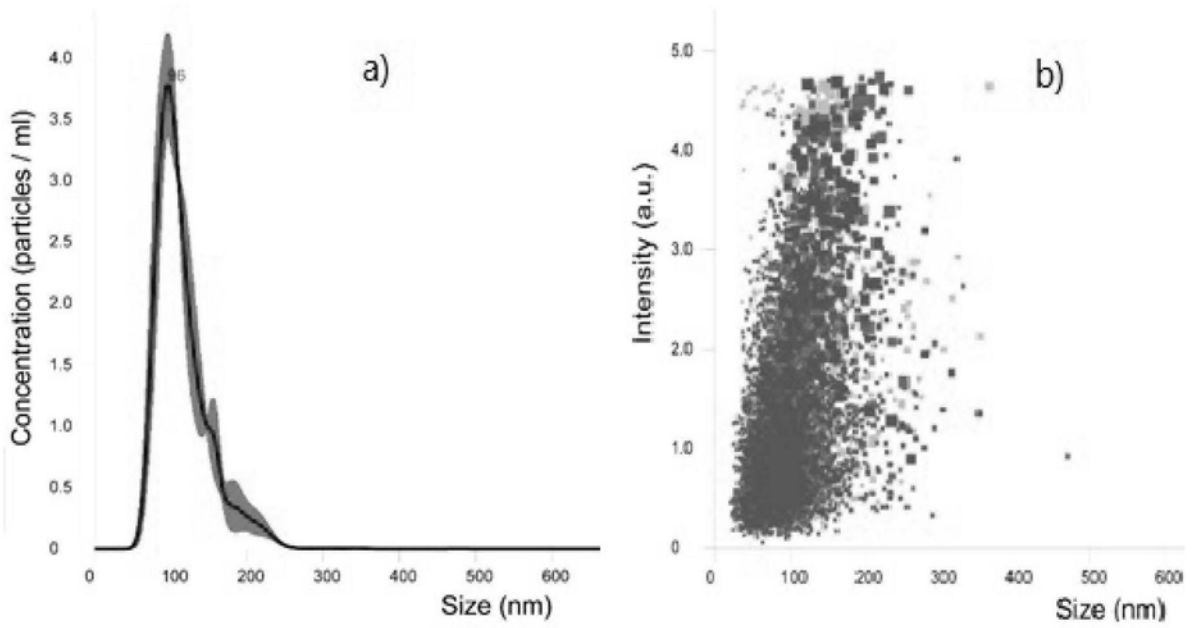


图5

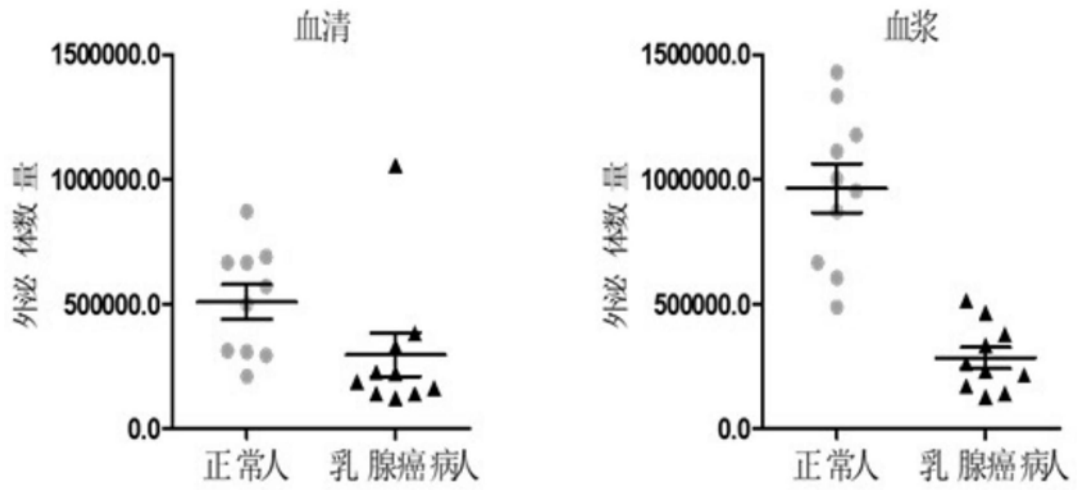


图6

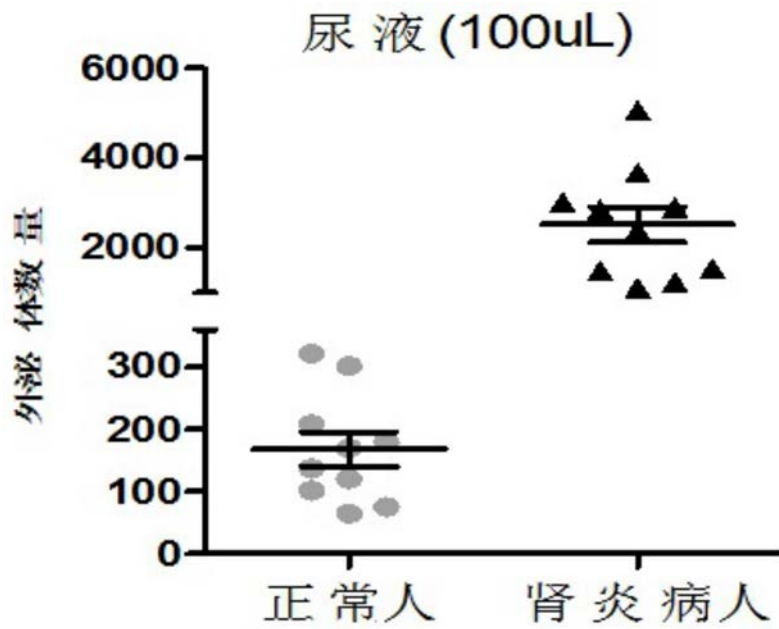


图7

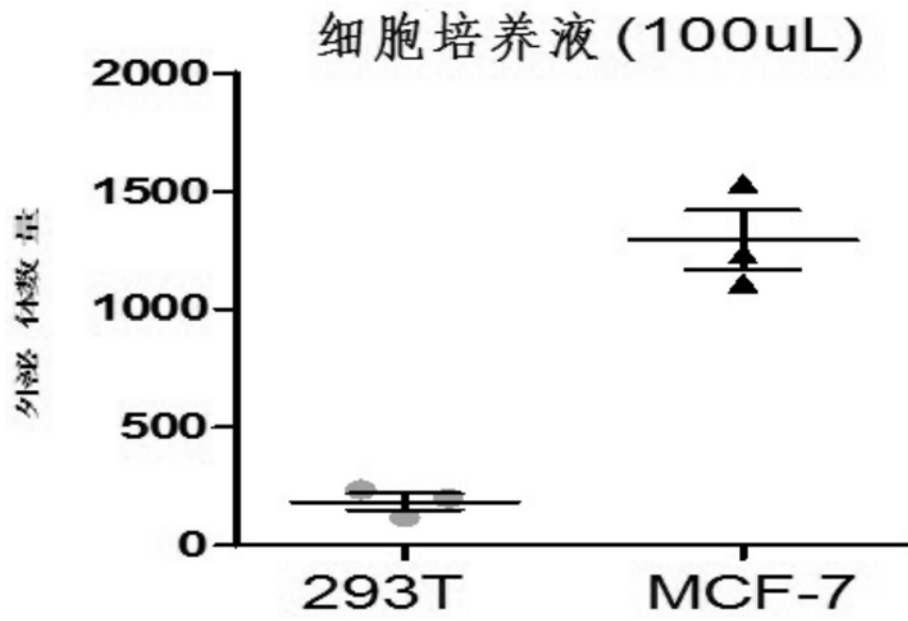


图8

专利名称(译)	一种流式细胞仪检测外泌体的方法		
公开(公告)号	CN110702589A	公开(公告)日	2020-01-17
申请号	CN201910961754.6	申请日	2019-10-11
[标]发明人	金芳芳 王延博		
发明人	金芳芳 王延博 徐学博 陈张朋 薛姜飞		
IPC分类号	G01N15/14 G01N23/2251 G01N33/537 G01N33/541		
CPC分类号	G01N15/1404 G01N23/2251 G01N33/537 G01N33/541		
代理人(译)	王新爱		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种流式细胞仪检测外泌体的方法，包括如下步骤：(1)收集样品，提取外泌体；(2)抗体孵育：将提取的外泌体用含2%BSA的PBS溶液溶解，先后进行一抗和二抗孵育，得到CD63标记的外泌体检测液；(3)流式细胞仪的参数设置：正常运行流式细胞仪，进行参数设置；(4)上机检测：将所述CD63标记的外泌体检测液加入PBS溶液重悬，上机检测；(5)利用流式细胞仪分析软件对数据进行分析，得到外泌体的定量检测结果。本发明属于生物检测技术领域，可有效对血清、血浆和尿液等不同样品中的外泌体进行定量分析，检测结果特异性强，且操作过程方便、快捷，重复性好。

