



(21)申请号 201910032544.9

(22)申请日 2019.01.14

(71)申请人 复旦大学附属华山医院

地址 200040 上海市静安区乌鲁木齐中路
12号

(72)发明人 董强 崔梅 国敏 陈兴栋
赵鸿琛 丁梦媛

(74)专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限公司 31225

代理人 林君如

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

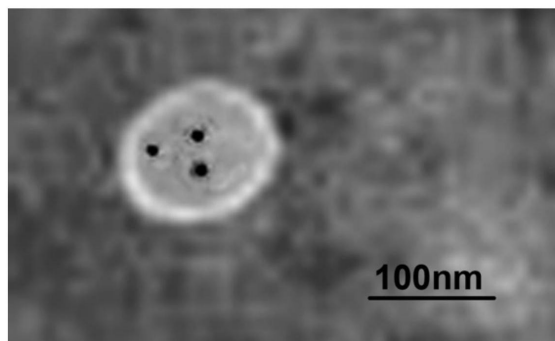
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的
外泌体免疫电镜方法

(57)摘要

本发明涉及一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法,具体包括以下步骤:(1)制备生物素化的抗体;(2)纯化目标亚型外泌体;(3)免疫标记。与现有技术相比,本发明克服了目前免疫电镜技术检测外泌体时纯度低、效率低的弊端,保留了其分辨率高的优势,适合检测位于生物医学标本来源外泌体的微量抗原的检测,阳性信号得率高,便于判断。



1. 一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 制备生物素化的一抗:用碱性缓冲溶液将生物素化的蛋白质稀释并充分透析,得到蛋白质溶液,向蛋白质溶液中加入N-羟基琥珀酰亚胺生物素的二甲亚砜溶液,搅拌,然后加入 NH_4Cl 溶液,搅拌、透析、洗脱后收集得到的生物素化的一抗样品;

(2) 纯化目标亚型外泌体:将生物样本离心分离,加入步骤(1)得到的生物素化的一抗孵育,然后与亲水性链霉素亲和磁珠混合孵育,磁分离,洗涤后再加入解离液孵育,磁分离后收集上清液,即得到纯化的目标亚型外泌体;

(3) 免疫标记:将步骤(2)中得到的外泌体重悬,然后将外泌体滴于parafilm膜上,将铜网置于液滴上漂浮,然后将铜网转移至PBS和 NH_4Cl 液滴中处理,然后转移至一抗孵育、洗涤,然后转移至胶体金二抗,洗涤,用磷钨酸复染,干燥后,得到待检测的标记外泌体。

2. 根据权利要求1所述的一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法,其特征在于,步骤(1)中所述的碱性缓冲溶液为0.1mol/L碳酸氢钠缓冲液或0.5mol/L硼酸缓冲液。

3. 根据权利要求1所述的一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法,其特征在于,步骤(1)中:所述蛋白质溶液的浓度为1mg/mL。

4. 根据权利要求1所述的一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法,其特征在于,步骤(1)中:N-羟基琥珀酰亚胺生物素的二甲亚砜溶液中每1mg N-羟基琥珀酰亚胺生物素溶于1mL二甲亚砜中,每1mL蛋白质溶液加入120 μL 的N-羟基琥珀酰亚胺生物素的二甲亚砜溶液。

5. 根据权利要求1所述的一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法,其特征在于,步骤(1)中: NH_4Cl 溶液浓度为1mol/L,每25 μg N-羟基琥珀酰亚胺生物素加1 μL NH_4Cl 溶液。

6. 根据权利要求1所述的一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法,其特征在于,步骤(1)中:透析在4 $^{\circ}\text{C}$ 下,采用磷酸盐缓冲液;洗脱时使用1mL的分子筛柱,以磷酸盐缓冲液缓慢洗脱。

7. 根据权利要求1所述的一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法,其特征在于,步骤(2)中:每1mg链霉素亲和磁珠加入5-10 μg 一抗样品。

8. 根据权利要求1所述的一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法,其特征在于,步骤(2)中:解离液为2%SDS+100mM DTT。

9. 根据权利要求1所述的一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法,其特征在于,步骤(3)中:复染的磷钨酸的浓度为2%,洗涤采用磷酸盐缓冲液。

10. 根据权利要求1所述的一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法,其特征在于,步骤(3)中:所述胶体金二抗采用磷酸盐缓冲液稀释,胶体金二抗和磷酸盐缓冲液的体积比为1:1000。

一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种外泌体标记方法,尤其是涉及一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法。

背景技术

[0002] 免疫电镜是生物医学领域广泛应用的技术手段,是免疫组织化学技术和电镜技术结合的产物,能够实现在超微结构水平上观察待测抗原在生物医学样品中的精确定位。胶体金标二抗标记法是现在免疫电镜技术常用的一种手段。胶体金二抗是第二抗体与直径不同的金颗粒通过静电作用形成复合物,胶体金二抗与一抗结合,再与其相应的抗原结合,在电镜下会观察到相应抗原表位的致密颗粒。

[0003] 外泌体是一种由细胞主动分泌到胞外的囊泡小体,直径为30-100nm,携带有来源细胞的多种蛋白和RNA成分,可作为细胞间信息交流和物质传递的媒介。外泌体的产生是由细胞膜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细胞外。所有培养的细胞类型均可分泌外泌体,且外泌体天然存在于体液中,人体细胞在正常及病理状态下均可分泌外泌体,包括血液、唾液、尿液、脑脊液和乳汁中。不同细胞产生的外泌体或者不同疾病状态下产生的外泌体内含物及膜表面蛋白都不尽相同,所以外泌体具有一些特性:1、细胞来源特异性,即外泌体除了通用标志物外,还有来源细胞的特异性标志物。2、疾病状态相关性,即外泌体内部可包含特定物质,与疾病状态有关。3、外泌体研究精确度要求高,因为外泌体粒子直径小,属于纳米级别,对仪器或者研究方法要求敏感度高,对外泌体提纯的纯度要求也高。有关外泌体分泌机制、外泌体内含物组成、外泌体靶向进入特定细胞、作为“运载物”的潜力和相应功能的精确分子机制刚刚开始研究。对外泌体的精准研究兴趣日益增长,无论是研究其功能还是了解如何将其用于微创诊断的开发。

[0004] 胶体金标记法免疫电镜是外泌体研究的非常重要的技术手段,可对外泌体进行形态鉴定,也可对外泌体所携带的特定蛋白进行胶体金标记显示。但是,既往的免疫电镜存在一些不足之处:1、纯度低,由于外泌体分离和纯化产物多是多种细胞来源的混合产物,所以在进行某种标志物染色的时候,由于混杂外泌体的干扰,目的粒子比例可能不高,视野中充满非目标外泌体干扰。2、效率低,传统胶体金免疫电镜做法步骤多,包括封闭、抗体孵育、反复洗涤、复染等二十几个步骤,用作电镜观察载体的铜网与外泌体的粘附是通过物理吸附的方式,在后续的每一步操作中都会产生外泌体脱落和损失,导致最终观察时外泌体数量稀少。

发明内容

[0005] 本发明的目的就是为了克服上述现有技术存在的缺陷而提供一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法。

[0006] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现:

[0007] 一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 制备生物素化的一抗:用碱性缓冲溶液将生物素化的蛋白质稀释并充分透析,得到蛋白质溶液,向蛋白质溶液中加入N-羧基琥珀酰亚胺生物素的二甲亚砜溶液,搅拌,然后加入NH₄Cl溶液,搅拌、透析、洗脱后收集得到的生物素化的一抗样品;

[0009] (2) 纯化目标亚型外泌体:将生物样本离心分离,加入步骤(1)得到的生物素化的一抗孵育,然后与亲水性链霉素亲和磁珠混合孵育,磁分离,洗涤后再加入解离液孵育,磁分离后收集上清液,即得到纯化的目标亚型外泌体;

[0010] (3) 免疫标记:将步骤(2)中得到的外泌体重悬,然后将外泌体滴于parafilm膜上,将铜网置于液滴上漂浮,然后将铜网转移至PBS和NH₄Cl液滴中处理,然后转移至一抗孵育、洗涤,然后转移至胶体金二抗,洗涤,用磷钨酸复染,干燥后,得到待检测的标记外泌体。

[0011] 优选的,步骤(1)中所述的碱性缓冲溶液为0.1mol/L碳酸氢钠缓冲液或0.5mol/L硼酸缓冲液。

[0012] 优选的,步骤(1)中:所述蛋白质溶液的浓度为1mg/mL。

[0013] 优选的,步骤(1)中:N-羧基琥珀酰亚胺生物素(NHSB)的二甲亚砜(DMSO)溶液中每1mg N-羧基琥珀酰亚胺生物素溶于1mL二甲亚砜中,每1mL蛋白质溶液加入120μL的N-羧基琥珀酰亚胺生物素的二甲亚砜溶液。

[0014] 优选的,步骤(1)中:NH₄Cl溶液浓度为1mol/L,每25μg N-羧基琥珀酰亚胺生物素加1μL NH₄Cl溶液。

[0015] 优选的,步骤(1)中:透析在4℃下,采用磷酸盐缓冲液(PBS),以除去游离的生物素;洗脱时使用1mL的分子筛柱,以磷酸盐缓冲液缓慢洗脱,收集1mL/管,蛋白质在1-3mL之间洗下。

[0016] 优选的,步骤(1)中制得的样品加入叠氮钠(终浓度0.5g/L)及1.0g/L BSA(牛血清白蛋白),将结合产物置4℃,避光保存,亦可加入50%重蒸甘油,置-20℃保存。

[0017] 优选的,步骤(1)中的生物样本为细胞培养上清、血液、唾液、尿液、脑脊液或乳汁,离心分离采用3000g*15分钟,去除细胞碎片等杂质。

[0018] 优选的,步骤(2)中:每1mg链霉素亲和磁珠加入5-10μg一抗样品。

[0019] 优选的,步骤(2)中:解离液为2%SDS(十二烷基硫酸钠)+100mM DTT(二硫苏糖醇)。

[0020] 优选的,步骤(3)中:复染的磷钨酸的浓度为2%,洗涤采用磷酸盐缓冲液。

[0021] 优选的,步骤(3)中:所述胶体金二抗采用磷酸盐缓冲液稀释,胶体金二抗和磷酸盐缓冲液的体积比为1:1000。

[0022] 优选的,步骤(3)中:干燥时吸干铜网边缘水分,置于滤纸片上,在白炽灯下干燥10min。

[0023] 本发明的基本思想是使用特异性分选磁珠筛选生物样本中特定标志物外泌体亚群,联合简化的胶体金标记免疫电镜技术,以实现外泌体研究中对精确度和微观性两方面的需求。

[0024] 本发明只需要通过普通离心条件结合现有的应用于细胞层面的抗体,就可以完成不同亚型外泌体的免疫标记和鉴定过程。外泌体特异性磁珠分离过程可推广至所有组织来源,分离纯化过程和免疫标记步骤均可批量操作,大大简化操作规程,节约成本,使外泌体

的免疫电镜检测阳性率和大大提高。

[0025] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0026] 1.生物素标记法可重复性高,磁珠、生物素和所需目标分子对应的抗体均为常规商品,不同实验所研究的目标分子不同,但只需要更换抗体为目标分子抗体,然后按照上述本发明所列的操作步骤进行包被即可得到有效的分选磁珠;

[0027] 2.可获得一致性高的外泌体用来进行后续免疫标记步骤,磁珠分选系统所得产物均为带有目标抗原分子的亚型;

[0028] 3.简化免疫标记步骤以减少外泌体损失,可增加观察视野中的阳性外泌体总数,便于观察、计数、分析;

[0029] 4.克服了目前免疫电镜技术检测外泌体时纯度低、效率低的弊端,保留了其分辨率高的优势;

[0030] 5.本发明适合检测位于生物医学标本来源外泌体的微量抗原的检测,阳性信号得率高,便于判断。

附图说明

[0031] 图1为按照本发明的磁珠分离系统所得外泌体产物用Western Blot检测外泌体特异性标记物Alix和Tsg101;

[0032] 图2用本发明方法分离的小鼠小胶质细胞来源CD11b+外泌体的纳米粒子追踪检测结果;

[0033] 图3为CD11b免疫染色的外泌体的透射电镜结果。

具体实施方式

[0034] 下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明。

[0035] 实施例1

[0036] 实施例中使用的主要仪器及试剂:CD11b抗体(abcam,ab128797,美国);电子显微镜(phillip CM120,日本);磁力架;胶体金二抗(abcam,ab105276,美国);NHSB:N-羟基琥珀酰亚胺生物素(有商品供应);分子筛柱(G25)。

[0037] 特异性CD11b分选磁珠系统联合胶体金标记小鼠小胶质细胞来源(CD11b+)外泌体免疫电镜方法。

[0038] 第一部分:制备生物素标记的CD11b抗体

[0039] 1、将CD11b抗体用0.1mol/L碳酸氢钠缓冲液(pH 8.0)稀释至1mg/mL。

[0040] 2、用0.1mol/L碳酸氢钠缓冲液(pH 8.0)对抗体充分透析。

[0041] 3、将1mg NHSB溶解在1mL DMSO中。

[0042] 4、将120 μ L NHSB溶液加入1mL稀释的CD11b溶液。

[0043] 5、在室温下持续搅拌,保温2~4小时。

[0044] 6、加入4.8 μ L浓度为1mol/L NH_4Cl ,在室温下搅拌10分钟。

[0045] 7、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下充分透析,以除去游离的生物素。

[0046] 8、将样品上1mL的分子筛柱,以PBS缓慢洗脱,收集1mL/管,抗体在1~3mL之间洗下。

[0047] 9、收集到的抗体加入叠氮钠(终浓度0.5g/L)、1.0g/L BSA以及50%重蒸甘油,置-20℃保存。

[0048] 第二部分:纯化目标亚型外泌体

[0049] 1、3mL细胞培养上清液经3000g*15分钟离心分离,去除细胞碎片等杂质。

[0050] 2、上清转移至新的15mL离心管中,加入第一步中制备的生物素化的一抗3μg,室温孵育2小时。

[0051] 3、在EP管中将上述步骤2中的样本与0.5mg亲水性链霉素亲和磁珠混合,室温孵育30分钟。

[0052] 4、EP管置于磁力架,磁分离1-2分钟,弃上清。

[0053] 5、PBS洗涤磁珠3次,弃上清。

[0054] 6、加入20uL解离液(2%SDS+100Mm DTT)60℃孵育5分钟,磁分离3分钟,收集上清。

[0055] 第三部分:外泌体免疫电镜步骤

[0056] 1、上述获得的外泌体加入20uL 4%多聚甲醛,室温固定10min。

[0057] 2、取20μL滴于parafilm膜上,并将铜网置于液滴上漂浮,室温吸收20min。

[0058] 3、将铜网转移至50μL PBS+50mM NH₄Cl液滴,室温3min,再重复转移至新的PBS+50mM NH₄Cl液滴,室温3min。

[0059] 4、铜网转移至20μL一抗液滴(PBS+0.2%tx-100稀释一抗),室温30min,一抗浓度10μg/mL。

[0060] 5、铜网转移至100μL PBS液滴,洗涤2次,每次3min。

[0061] 6、铜网转移至20μL胶体金二抗液滴(PBS稀释),室温20min。

[0062] 7、铜网转移至100μL PBS液滴,洗涤两次,每次2min。

[0063] 8、铜网转移至50μL 1%戊二醛液滴,室温5min。

[0064] 9、铜网转移至50μL 2%磷钨酸液滴,室温3min。

[0065] 10、吸干铜网边缘水分,置于滤纸片上,白炽灯下干燥10min。

[0066] 11、透射电镜观察。

[0067] 图1为按照本发明的磁珠分离系统所得外泌体产物用Western Blot检测外泌体特异性标记物Alix和Tsg101,Western blot条带显示在蛋白Alix(蛋白大小约150kDa)及Tsg101(蛋白大小约43kDa)位置出现特异性条带,说明纯化产物为外泌体。

[0068] 图2用本发明方法分离的小鼠小胶质细胞来源CD11b+外泌体的纳米粒子追踪检测结果,结果显示分离得到的CD11b+外泌体颗粒粒径分布在50-180nm之间,纯度较高。

[0069] 图3为用本发明方法分离的小鼠小胶质细胞来源CD11b+外泌体,用CD11b抗体进行免疫染色,透射电镜观察到外泌体形态,以及外泌体上附着的黑色胶体金粒子,来源于胶体金二抗,显示CD11b阳性。

[0070] 实施例2

[0071] 特异性CD11b分选磁珠系统联合胶体金标记小鼠小胶质细胞来源(CD11b+)外泌体免疫电镜方法。

[0072] 第一部分:制备生物素标记的CD11b抗体

[0073] 1、将CD11b抗体用0.5mol/L硼酸缓冲液(pH 8.6)稀释至1mg/mL。

[0074] 2、用0.5mol/L硼酸缓冲液(pH 8.6)对抗体充分透析。

- [0075] 3、将1mg NHSB溶解在1mL DMSO中。
- [0076] 4、将120μL NHSB溶液加入1mL稀释的CD11b溶液。
- [0077] 5、在室温下持续搅拌,保温2~4小时。
- [0078] 6、加入9.6μL浓度为1mol/L NH₄Cl,在室温下搅拌10分钟。
- [0079] 7、4℃条件下充分透析,以除去游离的生物素。
- [0080] 8、将样品上1mL的分子筛柱,以PBS缓慢洗脱,收集1mL/管,抗体在1~3mL之间洗下。
- [0081] 9、收集到的抗体加入叠氮钠(终浓度0.5g/L)、1.0g/L BSA,置4℃保存。
- [0082] 第二部分:纯化目标亚型外泌体
- [0083] 1、3mL细胞培养上清液经3000g*15分钟离心分离,去除细胞碎片等杂质。
- [0084] 2、上清转移至新的15mL离心管中,加入第一步中制备的生物素化的一抗2.5μg,室温孵育2小时。
- [0085] 3、在EP管中将上述步骤2中的样本与0.5mg亲水性链霉素亲和磁珠混合,室温孵育30分钟。
- [0086] 4、EP管置于磁力架,磁分离1-2分钟,弃上清。
- [0087] 5、PBS洗涤磁珠3次,弃上清。
- [0088] 6、加入20uL解离液(2%SDS+100Mm DTT) 60℃孵育5分钟,磁分离3分钟,收集上清。
- [0089] 第三部分:外泌体免疫电镜步骤
- [0090] 1、上述获得的外泌体加入20uL 4%多聚甲醛,室温固定10min。
- [0091] 2、取20μL滴于parafilm膜上,并将铜网置于液滴上漂浮,室温吸收20min。
- [0092] 3、将铜网转移至50μL PBS+50mM NH₄Cl液滴,室温3min,再重复转移至新的PBS+50mM NH₄Cl液滴,室温3min。
- [0093] 4、铜网转移至20μL一抗液滴(PBS+0.2% tx-100稀释一抗),室温30min,一抗浓度10μg/mL。
- [0094] 5、铜网转移至100μL PBS液滴,洗涤2次,每次3min。
- [0095] 6、铜网转移至20μL胶体金二抗液滴(PBS稀释),室温20min。
- [0096] 7、铜网转移至100μL PBS液滴,洗涤两次,每次2min。
- [0097] 8、铜网转移至50μL 1%戊二醛液滴,室温5min。
- [0098] 9、铜网转移至50μL 2%磷钨酸液滴,室温3min。
- [0099] 10、吸干铜网边缘水分,置于滤纸片上,白炽灯下干燥10min。
- [0100] 11、透射电镜观察。
- [0101] 实施例3
- [0102] 特异性CD11b分选磁珠系统联合胶体金标记小鼠小胶质细胞来源(CD11b+) 外泌体免疫电镜方法。
- [0103] 第一部分:制备生物素标记的CD11b抗体
- [0104] 1、将CD11b抗体用0.5mol/L硼酸缓冲液(pH 8.6)稀释至1mg/mL。
- [0105] 2、用0.5mol/L硼酸缓冲液(pH 8.6)对抗体充分透析。
- [0106] 3、将1mg NHSB溶解在1mL DMSO中。
- [0107] 4、将120μL NHSB溶液加入1mL稀释的CD11b溶液。

- [0108] 5、在室温下持续搅拌,保温2~4小时。
- [0109] 6、加入9.6μL浓度为1mol/L NH₄Cl,在室温下搅拌10分钟。
- [0110] 7、4℃条件下充分透析,以除去游离的生物素。
- [0111] 8、将样品上1mL的分子筛柱,以PBS缓慢洗脱,收集1mL/管,抗体在1~3mL之间洗下。
- [0112] 9、收集到的抗体加入叠氮钠(终浓度0.5g/L)、1.0g/L BSA,置4℃保存。
- [0113] 第二部分:纯化目标亚型外泌体
- [0114] 1、3mL细胞培养上清液经3000g*15分钟离心分离,去除细胞碎片等杂质。
- [0115] 2、上清转移至新的15mL离心管中,加入第一步中制备的生物素化的一抗5μg,室温孵育2小时。
- [0116] 3、在EP管中将上述步骤2中的样本与0.5mg亲水性链霉素亲和磁珠混合,室温孵育30分钟。
- [0117] 4、EP管置于磁力架,磁分离1-2分钟,弃上清。
- [0118] 5、PBS洗涤磁珠3次,弃上清。
- [0119] 6、加入20μL解离液(2%SDS+100mM DTT) 60℃孵育5分钟,磁分离3分钟,收集上清。
- [0120] 第三部分:外泌体免疫电镜步骤
- [0121] 1、上述获得的外泌体加入20μL 4%多聚甲醛,室温固定10min。
- [0122] 2、取20μL滴于parafilm膜上,并将铜网置于液滴上漂浮,室温吸收20min。
- [0123] 3、将铜网转移至50μL PBS+50mM NH₄Cl液滴,室温3min,再重复转移至新的PBS+50mM NH₄Cl液滴,室温3min。
- [0124] 4、铜网转移至20μL一抗液滴(PBS+0.2%tx-100稀释一抗),室温30min,一抗浓度10μg/mL。
- [0125] 5、铜网转移至100μL PBS液滴,洗涤2次,每次3min。
- [0126] 6、铜网转移至20μL胶体金二抗液滴(PBS稀释),室温20min。
- [0127] 7、铜网转移至100μL PBS液滴,洗涤两次,每次2min。
- [0128] 8、铜网转移至50μL 1%戊二醛液滴,室温5min。
- [0129] 9、铜网转移至50μL 2%磷钨酸液滴,室温3min。
- [0130] 10、吸干铜网边缘水分,置于滤纸片上,白炽灯下干燥10min。
- [0131] 11、透射电镜观察。
- [0132] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改,并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此,本发明不限于上述实施例,本领域技术人员根据本发明的揭示,不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。



图1

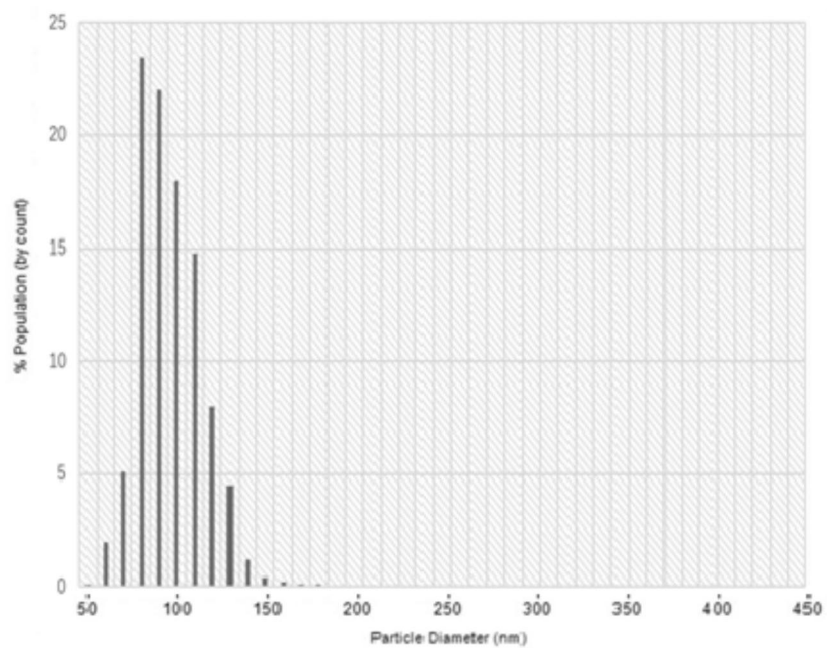


图2

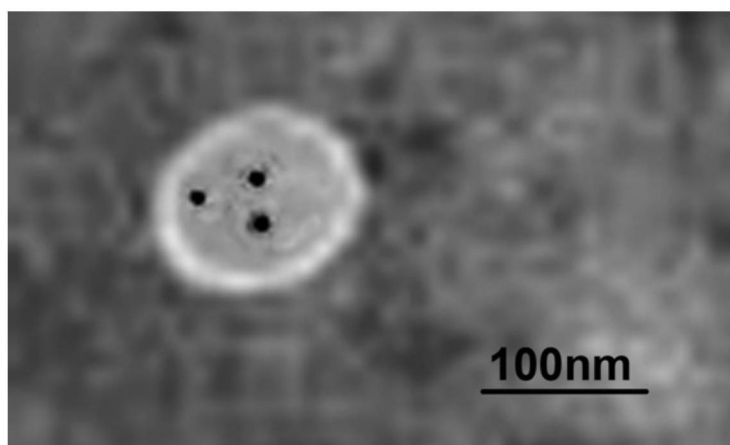


图3

专利名称(译)	一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法		
公开(公告)号	CN109738630A	公开(公告)日	2019-05-10
申请号	CN201910032544.9	申请日	2019-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
[标]发明人	董强 崔梅 陈兴栋 赵鸿琛		
发明人	董强 崔梅 国敏 陈兴栋 赵鸿琛 丁梦媛		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/543 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种高灵敏的磁珠分选联合胶体金标记的外泌体免疫电镜方法，具体包括以下步骤：(1)制备生物素化的抗体；(2)纯化目标亚型外泌体；(3)免疫标记。与现有技术相比，本发明克服了目前免疫电镜技术检测外泌体时纯度低、效率低的弊端，保留了其分辨率高的优势，适合检测位于生物医学标本来源外泌体的微量抗原的检测，阳性信号得率高，便于判断。

