



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108593910 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201810306124.0

(22)申请日 2018.04.08

(71)申请人 国家纳米科学中心

地址 100190 北京市海淀区中关村北一条
11号

(72)发明人 孙佳姝 刘超 田飞

(74)专利代理机构 北京精金石知识产权代理有
限公司 11470

代理人 张黎

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

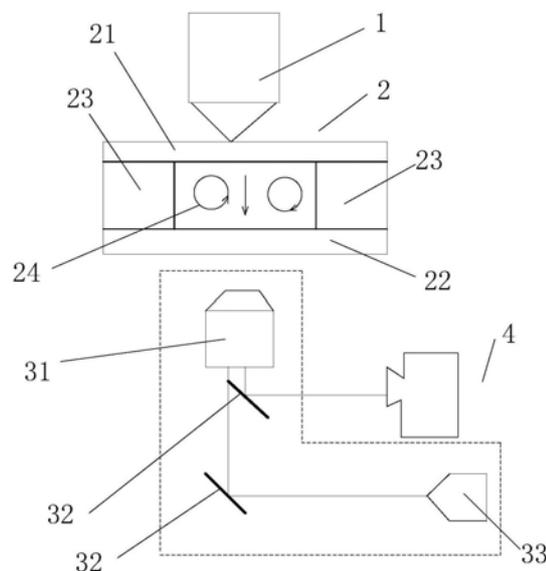
权利要求书2页 说明书10页 附图6页

(54)发明名称

基于微球载体的粒子检测系统及方法

(57)摘要

本发明涉及一种基于微球载体的粒子检测系统及方法,本系统包括加热单元、样品仓室单元,其中,所述样品仓室单元内装载有结合有目标生物分子的免疫微球流体,所述免疫微球为抗体或适体固定在微球表面而制得,所述结合有目标生物分子的免疫微球采用荧光标记,在加热单元对所述样品仓室单元加热后,所述样品仓室单元内产生热泳效应,将所述外泌体汇聚在所述样品仓室单元内温度较低的一侧,以将样品室内的结合有目标生物分子的免疫微球上标记的荧光信号放大,以进行检测。本发明游离蛋白、核酸等生物大分子在微米尺寸的球体表面修饰能与目标蛋白、核酸特异性结合的抗体或适体,得到免疫微球,以对游离态的粒子进行汇聚,并在汇聚后进行检测。



CN 108593910 A

1. 一种基于微球载体的粒子检测系统,其特征在于,包括加热单元、样品仓室单元,其中,

所述加热单元,用以向所述样品仓室单元内的样品加热;

所述样品仓室单元内装载有结合有目标生物分子的免疫微球流体,所述免疫微球为抗体或适体固定在微球表面而制得,所述结合有目标生物分子的免疫微球采用荧光标记,在所述加热单元对所述样品仓室单元加热后,所述样品仓室单元内产生热泳效应,将所述外泌体汇聚在所述样品仓室单元内温度较低的一侧,以将样品室内的结合有目标生物分子的免疫微球上标记的荧光信号放大,以进行检测。

2. 根据权利要求1所述的基于微球载体的粒子检测系统,其特征在于,所述系统还包括信号采集单元,所述信号采集单元获取放大后的荧光信号,得出免疫微球表面所结合的目标生物分子的丰度,通过将各种适体分别与结合有目标生物分子的免疫微球表面的不同靶蛋白结合得出检测结果。

3. 根据权利要求2所述的基于微球载体的粒子检测系统,其特征在于,所述样品仓室单元包括装载结合有目标生物分子的免疫微球并用以提供产生热泳效应空间的密闭样品室,所述样品室包括:用以封闭所述样品室并聚积所述微纳粒子的第二导热面。

4. 根据权利要求3所述的基于微球载体的粒子检测系统,其特征在于,所述第二导热面附近温度低于所述微纳粒子流体的温度,以在所述第二导热面与所述结合有目标生物分子的免疫微球流体之间产生温差,产生热泳效应,驱使结合有目标生物分子的免疫微球向第二导热面定向移动。

5. 根据权利要求3所述的基于微球载体的粒子检测系统,其特征在于,所述加热单元为设置在所述样品仓室单元外侧的激光器,其向所述样品仓室单元照射,光束依次通过所述结合有目标生物分子的免疫微球流体和第二导热面,以对所述结合有目标生物分子的免疫微球溶液产生热泳效应。

6. 根据权利要求5所述的基于微球载体的粒子检测系统,其特征在于,所述样品室还包括:用以封闭所述样品室的第一导热面,所述第二导热面和第一导热面均可使光束通过。

7. 根据权利要求6所述的基于微球载体的粒子检测系统,其特征在于,所述第二导热面为透明材质,其为蓝宝石材质或钻石材质;

所述第一导热面为玻璃、聚甲基丙烯酸甲酯、聚二甲基硅氧烷、蓝宝石中的任一种或任几种的组合。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的基于微球载体的粒子检测系统,其特征在于,所述微球为聚苯乙烯微球。

9. 一种基于微球载体的粒子检测方法,其特征在于,包括:

制备免疫微球,将微球与抗体或适体共同孵育,使抗体或适体固定在微球表面,得到免疫微球;

将免疫微球与待检测样品进行孵育,待检测样品中的目标蛋白或核酸与免疫微球上的抗体或适体进行特异性结合,从而固定在免疫微球上;

将上述制得的结合有目标生物分子的免疫微球与携带荧光基团的抗体或适体结合,将免疫微球上的目标生物分子标记荧光;

对样品仓室单元内装载的结合有目标生物分子的免疫微球样品进行加热,在样品仓室

单元产生热泳效应,以将结合有目标生物分子的免疫微球汇聚在所述样品仓室单元内的低温一侧,并由于荧光标记富集而使信号放大,以进行检测。

10.根据权利要求9所述的基于微球载体的粒子检测方法,其特征在于,通过对所述样品仓室单元内的低温一侧聚积的结合有目标生物分子的免疫微球,采集结合有目标生物分子的免疫微球相应指标信息并对相应指标进行分析。

基于微球载体的粒子检测系统及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微纳粒子检测领域,尤其涉及一种基于微球载体的粒子检测系统及方法。

背景技术

[0002] 现有技术中对微纳粒子进行检测,以测量微粒大小、形状、浓度、活性等,在血液学、免疫学、分子生物学等学科有较为广泛的应用。现有技术中常采用流式微粒检测方法对微纳粒子进行检测,其是对处于液体中的微粒颗粒逐个进行定量分析和分选的技术,在检测中所采用的库尔特原理是指:悬浮在电解液中的颗粒随电解液通过小孔时,取代相同体积的电解液,在恒电流设计的电路中导致小孔内外两电极间电阻发生瞬间变化,产生电位脉冲,脉冲信号的大小和次数与颗粒的大小和数目成正比。样品聚焦是流式微粒检测的关键技术,目前的检测中都是通过外力作用对样品液实现聚焦。聚焦又分为通过鞘液聚焦和无需鞘液的聚焦。

[0003] 其中,鞘液聚焦如中国专利201210482142.7公开的《微流体微粒仪及制作方法》中,利用外界注射泵的压力分别从样品液入口注入样品液,从鞘液入口注入鞘液,然后样品液和两路鞘液同时流到鞘流汇聚区,鞘液的聚集作用将样品液中的微粒颗粒包夹成线性排列流入检测区进行检测。这种方法中两个鞘流和样品液都需要驱动源,采用一个电机控制三个管道的方式,这样不仅设备变得很庞大,成本也提高,更为重要的是由于每次进行检测时需要更换芯片,那么每次都检测都需要重新将三个通道与电机进行连接,这个连接处的密封性问题就会影响到对三个通道的压力的大小,造成聚焦效果不好,测试结果就不够精确。

[0004] 其中,无需鞘液的聚焦,如中国专利201310283051.5公开的《一种用于流式微粒仪的微流控芯片结构及其制作方法》,其采用锥形聚焦结构,认为其具有类似与传统的鞘液流系统的聚焦效果,使得微粒颗粒单个流入微通道,微通道通过通道束缚微粒使其单个通过检测区,在高浓度样本的检测条件下造成检测结果的不精确。

[0005] 在上述两种检测微纳粒子的技术方案中,一方面,通过电解产生电位脉冲,采用电化学方法对纳米颗粒进行分离及检测,形成含微纳粒子的流束,所需样品的量极大;另一方面,通过诸如电机的驱动源,同时采用固定结构的单一的通道,限定微纳粒子的流动方向及聚积方向,在施加外作用力以及通道限定的过程中,外力作用于流体,往往针对于微纳粒子的施力是不可控的。

[0006] 尤其针对微纳生物粒子,诸如外泌体的检测,外泌体是由细胞分泌的膜泡,用于细胞间交流,因其含有与母细胞相关的蛋白及遗传物质,近年来逐渐成为一种新兴的非侵入式肿瘤诊断的生物标志物。

[0007] 现有技术中通常采用:其一,酶联免疫吸附测定,即ELISA,指将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上,利用抗原抗体结合专一性进行免疫反应的定性和定量检测方法,在测定时,把受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体按不同的步骤

与固相载体表面的抗原或抗体起反应；用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开，最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化变为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据颜色反应的深浅判定定性或定量分析。

[0008] 其二，蛋白质印迹法，即Western Blot，其基本原理是通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的细胞或生物组织样品进行着色；通过分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中表达情况的信息。

[0009] 上述两种技术方案，一方面对样本进行分离及聚积，需采用特殊的设备及方法；另一方面，检测方法需要采用大量的样品，往往针对血清进行癌变检测的过程不具有适应性。

[0010] 欧洲专利公开号EP2783747，还公开了一种利用对热流的液体混合方法，但其通过使液体通过毛细管中，并且，毛细管放置于重力平行和/或反平行地引导，由于在毛细管中引导液体，粒子中液体不能向指定的同一方向运动，不能聚积，因此，不能通过该引导方法进行微粒子的检测。尤其，对于游离态的粒子，如游离蛋白、核酸等生物大分子不能进行聚积，也不能实现对粒子的检测。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于提供一种基于微球载体的粒子检测系统及方法，用以克服现有技术中不能对游离态的粒子的聚积检测技术缺陷。

[0012] 为实现上述目的，本发明提供一种基于微球载体的粒子检测系统，包括加热单元、样品仓室单元，其中，

[0013] 所述加热单元，用以向所述样品仓室单元内的样品加热；

[0014] 所述样品仓室单元内装载有结合有目标生物分子的免疫微球流体，所述免疫微球为抗体或适体固定在微球表面而制得，所述结合有目标生物分子的免疫微球采用荧光标记，在所述加热单元对所述样品仓室单元加热后，所述样品仓室单元内产生热泳效应，将所述外泌体汇聚在所述样品仓室单元内温度较低的一侧，以将样品室内的结合有目标生物分子的免疫微球上标记的荧光信号放大，以进行检测。

[0015] 进一步地，所述系统还包括信号采集单元，所述信号采集单元获取放大后的荧光信号，得出免疫微球表面所结合的目标生物分子的丰度，通过将各种适体分别与结合有目标生物分子的免疫微球表面的不同靶蛋白结合得出检测结果。

[0016] 进一步地，所述样品仓室单元包括装载结合有目标生物分子的免疫微球并用以提供产生热泳效应空间的密闭样品室，所述样品室包括：用以封闭所述样品室并聚积所述微纳粒子的第二导热面。

[0017] 进一步地，所述第二导热面附近温度低于所述微纳粒子流体的温度，以在所述第二导热面与所述结合有目标生物分子的免疫微球流体之间产生温差，产生热泳效应，驱使结合有目标生物分子的免疫微球向第二导热面定向移动。

[0018] 进一步地，所述加热单元为设置在所述样品仓室单元外侧的激光器，其向所述样品仓室单元照射，光束依次通过所述结合有目标生物分子的免疫微球流体和第二导热面，以对所述结合有目标生物分子的免疫微球溶液产生热泳效应。

[0019] 进一步地，所述样品室还包括：用以封闭所述样品室的第一导热面，所述第二导热

面和第一导热面均可使光束通过。

[0020] 进一步地,所述第二导热面为透明材质,其为蓝宝石材质;

[0021] 所述第一导热面为玻璃、聚甲基丙烯酸甲酯、聚二甲基硅氧烷、蓝宝石中的任一种或任几种的组合。

[0022] 进一步地,所述微球为聚苯乙烯微球。

[0023] 本发明还提供一种基于微球载体的粒子检测方法,包括:

[0024] 制备免疫微球,将微球与抗体或适体共同孵育,使抗体或适体固定在微球表面,得到免疫微球;

[0025] 将免疫微球与待检测样品进行孵育,待检测样品中的目标蛋白或核酸与免疫微球上的抗体或适体进行特异性结合,从而固定在免疫微球上;

[0026] 将上述制得的结合有目标生物分子的免疫微球与携带荧光基团的抗体或适体结合,将免疫微球上的目标生物分子标记荧光;

[0027] 对样品仓室单元内装载的结合有目标生物分子的免疫微球样品进行加热,在样品仓室单元产生热泳效应,以将结合有目标生物分子的免疫微球汇聚在所述样品仓室单元内的低温一侧,并由于荧光标记富集而使信号放大,以进行检测。

[0028] 进一步地,通过对所述样品仓室单元内的低温一侧聚积的结合有目标生物分子的免疫微球,采集结合有目标生物分子的免疫微球相应指标信息并对相应指标进行分析。

[0029] 与现有技术相比本发明的有益效果在于,本发明微纳检测系统通过对微纳粒子所在的样品仓室单元的其中一方向进行加热,引入热泳效应及对流,使样品仓室单元产生温差,在远离加热单元的一侧产生低温,热泳效应使样品中微纳粒子迁移并聚积到样品仓室单元,以完成微纳粒子的聚积;同时,由于样品液体受热膨胀产生浮力从而在样品仓室单元中产生对流,在样品仓室单元的低温区域,对流的方向从周围指向样品仓室单元的加热区域,进一步促进微纳粒子的聚积。

[0030] 尤其,本发明游离蛋白、核酸等生物大分子或者外泌体中未暴露在表面的蛋白、核酸等生物大分子,在微米尺寸的球体表面修饰能与目标蛋白、核酸特异性结合的抗体或适体,得到免疫微球,并将其与含有目标生物大分子的样品孵育并与目标生物大分子结合并标记荧光,以对游离态的粒子或未暴露在表面的目标生物大分子进行汇聚,并在汇聚后进行检测。

[0031] 进一步地,本系统将含有外泌体的待测样品与荧光标记的适体或抗体孵育,通过适体或抗体与外泌体表面蛋白特异性结合将外泌体标记上荧光;将孵育好的样品放入上下透明的样品室,并放置在荧光显微镜载物台上进行观测,红外激光器照射透过样品室作用与样品,通过热泳作用将样品中外泌体高度富集在样品室底部的激光光点处,使得外泌体荧光高度放大,并通过荧光强弱检测某种外泌体表面蛋白的丰度。

[0032] 进一步地,本系统采用激光对样品室照射进行加热,通过在样品室相对侧面设置导热性能不同的透明导热面,在两个导热面之间产生温差,以产生热泳效应,驱使微纳粒子从第一导热面低温较低的第二导热面定向移动。尤其采用光束加热,不需要采用其他辅助设备,只需样品室上下设置透明的导热面即可。并且,微纳粒子在热泳效应下受力与粒子直径平方成正比,而与微纳粒子数量多少无关,因此,只需微量的微纳粒子即可完成汇聚及检测,对于外泌体仅需0.1微升的样本用量,操作方便,无需特殊仪器,并且无需样品前处理和

外泌体提纯,通用于适体和抗体;不限于外泌体,其他细胞外囊泡、细胞等微纳生物粒子均可。

[0033] 尤其是,本发明系统及方法,可以选择特定温度下完成测量,不受具体温度的限定,只需能够产生温差以聚积粒子即可;还可在各种不同的溶液环境中完成测量,包括研究膜蛋白所需的复杂的去污剂环境;还可对各种不同大小的分子:如离子、核酸片段、核小体、脂质体进行检测,在具体进行检测时,系统可根据颗粒自身的物理性能及颗粒的大小,调整温差、上下导热面之间的高度、流体的种类及激光照射的频率等参数进行调整,上述各个参数的调整,均能够实现定量的调整,控制精准,调节方便。

[0034] 本发明基于热泳效应聚积粒子,对微纳粒子的装载容器没有限定,尤其在体积较大的容器中,更容易粒子在热泳效应下聚积,而不需考虑采用毛细管等载体容器进行引导。

附图说明

[0035] 图1为本发明的微纳粒子检测系统的结构框图;

[0036] 图2为本发明的基于外泌体的信号检测流程框图;

[0037] 图3为本发明实施例1的外泌体在试验前后的对比图谱;

[0038] 图4为本发明实施例2的外泌体在检测后的各表面蛋白图谱及对应的各表面蛋白表达量示意图;

[0039] 图5为本发明实施例2各类癌症患者于健康人的血清外泌体的各类蛋白表达量的示意图;

[0040] 图6为本发明实施例3的不同直径的荧光聚苯乙烯微球的荧光测量灰度值示意图;

[0041] 图7为本发明实施例4的卵巢癌患者和健康人血清中11种蛋白标志物表达量的示意图;

[0042] 图8为本发明实施例4的11不同标志物和其总和作为区别癌症与健康标准的正确率示意图。

具体实施方式

[0043] 以下结合附图,对本发明上述的和另外的技术特征和优点作更详细的说明。

[0044] 下面参照附图来描述本发明的优选实施方式。本领域技术人员应当理解的是,这些实施方式仅仅用于解释本发明的技术原理,并非旨在限制本发明的保护范围。

[0045] 需要说明的是,在本发明的描述中,术语“上”、“下”、“左”、“右”、“内”、“外”等指示的方向或位置关系的术语是基于附图所示的方向或位置关系,这仅仅是为了便于描述,而不是指示或暗示所述装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作,因此不能理解为对本发明的限制。此外,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性。

[0046] 此外,还需要说明的是,在本发明的描述中,除非另有明确的规定和限定,术语“安装”、“相连”、“连接”应做广义理解,例如,可以是固定连接,也可以是可拆卸连接,或一体地连接;可以是机械连接,也可以是电连接;可以是直接相连,也可以通过中间媒介间接相连,可以是两个元件内部的连通。对于本领域技术人员而言,可根据具体情况理解上述术语在本发明中的具体含义。

[0047] 请参阅图1所示,其为本发明的微纳粒子检测系统的结构框图,本实施例的系统包括加热单元1、样品仓室单元2、信号采集单元4,其中,所述加热单元1设置在所述样品仓室单元2的外侧,用以向所述样品仓室单元2内的样品加热;所述样品仓室单元2内装载有微纳粒子,在所述加热单元1对所述样品仓室单元2加热后,所述样品仓室单元2内产生热泳效应,以将微纳粒子汇聚在所述样品仓室单元2内远离所述加热单元1的一侧;所述信号采集单元4,其在所述样品仓室单元2内的微纳粒子聚积后,其采集所述微纳粒子的相关信号信息,并对相应的微纳粒子进行相应分析。本系统利用热泳效应,即物体在温度梯度作用下的定向迁移,通过红外激光照射在样品局部产生温度梯度场,使样品中的外泌体迁移到温度较低处。通过对微纳粒子所在的样品仓室单元2的其中一方向进行加热,引入热泳效应及对流,使样品仓室单元2产生温差中的微纳粒子流体与样品仓室单元2的一侧产生低温温差,并使样品仓室单元2的一侧的温度低于微纳粒子流体的温度,热泳效应使样品中微纳粒子迁移并聚积到样品仓室单元2的低温一侧;同时,由于样品液体流体受热膨胀产生浮力从而在样品仓室单元2中产生对流。在样品仓室单元2的低温区域,对流的方向从周围指向样品仓室单元2的加热区域,如图1中箭头所指方向,起到传送带作用将周围微纳粒子汇聚在样品仓室单元2的样品仓室单元2低温一侧,从而起到聚积微纳粒子的作用。因此,本发明基于热泳效应聚积粒子,对微纳粒子的装载容器没有限定,尤其在体积较大的容器中,更容易粒子在热泳效应下聚积,而不需考虑采用毛细管等载体容器进行引导。

[0048] 具体而言,本实施例的加热单元1为激光器,其设置在样品仓室单元2的外侧,对样品仓室单元2内进行照射,以在其内部产生圆形的加热区域,当然加热区域也可以为线性或者其它方式。本领域技术人员可以理解的是,加热方式并不仅限于激光照射,激光照射方向只需能够确保产生热源即可,功率的选择取决于照射方向,光点直径、波长等因素,均可根据实际的微纳粒子及使用环境而改变。

[0049] 具体而言,样品仓室单元2包括装载微纳粒子样品并用以提供产生热泳效应空间的密闭样品室24,样品室24包括用以封闭样品室24的第一导热面21,以及用以封闭样品室24的第二导热面22,在本实施例中,样品室24装载的微纳粒子流体与第二导热面22之间产生温差,以产生热泳效应,驱使微纳粒子从微纳粒子流体向第二导热面22定向移动。因此,本实施例将所述第二导热面22的附近的温度低于微纳粒子流体的温度。

[0050] 在本实施例中,采用激光器对样品室24进行加热,所述第一导热面21、第二导热面22相对设置,所述第二导热面22的导热性大于第一导热面21,第二导热面22的散热性能大于第一导热面21,且两个导热面均为透明材质,便于对微纳粒子进行观测,因此,第二导热面22的温度低于第一导热面21的温度,也使得微纳粒子流体的温度低于第二导热面22的温度。所述样品室24还包括用以密封样品室24的垫片23,本领域技术人员可以理解的是,两个导热面21可相对设置或相邻设置,或相互之间按照预设夹角布置,只需驱使微纳粒子沿设定的某一方向运动、聚积即可。本实施例的流体可以为液体,如水,或水的混合液,也可以为气体,如加热气体或自然态气体,只需能够装载微纳粒子,并能够允许微纳粒子在流体中自由移动,以便利用热泳效应聚积即可。同时,第一导热面21和第二导热面22为透明的,可以通过红外线依次穿过第一导热面和第二导热面,并将热量带入所述流体中,当然也可以为电磁辐射,产生热量,以使样品室产生温差。

[0051] 作为较优的实施例,第一导热面21为玻璃、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚二甲基硅

氧烷(PDMS)、蓝宝石等,第二导热面22为导热性良好的蓝宝石或钻石。激光通过顺次照射第一导热面21、装载微纳粒子的样品室24、第二导热面22,在第二导热面22产生低温区。将激光焦点调节至样品室24内,样品室24内激光经过区域的样品液体吸收激光并温度升高,热泳效应使样品中微纳粒子迁移到温度较低的第二导热面22,同时由于样品液体受热膨胀产生浮力从而在样品室中产生对流;在第二导热面22附近的低温方向,对流的方向从周围指向激光照射点,起到传送带作用将周围微纳粒子汇聚在激光照射点下方的样品室第二导热面22的区域,从而增强微纳粒子聚积。

[0052] 在本发明其中一实施例中,微纳粒子选择为外泌体,外泌体是由细胞分泌的膜泡,用于细胞间交流,因其含有与母细胞相关的蛋白及遗传物质,近年来逐渐成为一种新兴的非侵入式肿瘤诊断的生物标志物。本实施例基于外泌体的具体原理如下所述。

[0053] 外泌体热泳运动模型:

$$[0054] \quad v_T = -S_T D \nabla T \quad (1)$$

[0055] 其中, v_T 为热泳速度, S_T 为Soret系数, D 为扩散系数, ∇T 为温度梯度,模型公式右端负号表示热泳方向为低温方向。

[0056] 上述公式(1)中的Soret系数计算公式:

$$[0057] \quad S_T = \frac{A}{kT} \left(-s_{hyd} + \frac{\beta \sigma_{eff}^2 \lambda_{DH}}{4\epsilon\epsilon_0 T} \right) \quad (2)$$

[0058] 其中, A 为外泌体表面积, k 为玻尔兹曼常数, T 为温度, s_{hyd} 为水合作用熵, β 为系数, σ_{eff} 为外泌体表面等效电荷密度, λ_{DH} 为德拜长度, ϵ_0 为真空介电常数, ϵ 相对介电常数。综合上述公式(1)-(2),可知外泌体热泳受力与直径平方成正比。

[0059] 外泌体在热对流中迁移模型:

$$[0060] \quad \frac{dv_p}{dt} = \frac{18\eta}{\rho_p a^2} \frac{C_D Re_s}{24} (\mathbf{u} - \mathbf{v}_p) + \frac{\mathbf{g}(\rho_p - \rho)}{\rho_p} + \frac{1}{2} \frac{\rho}{\rho_p} \frac{d(\mathbf{u} - \mathbf{v}_p)}{dt} \quad (3)$$

$$[0061] \quad C_D = a_1 + \frac{a_2}{Re_s} + \frac{a_3}{Re_s^2} \quad (4)$$

$$[0062] \quad Re_s = \rho a |u - v_p| / \eta \quad (5)$$

[0063] 其中, v_p 为外泌体在热对流作用下的运动速度, a 为外泌体直径, u 为热对流速度, C_D 为黏性系数,可根据公式(4)计算,其中 a_1 、 a_2 、 a_3 为常数, Re_s 为相对运动雷诺数,可根据公式(5)计算, g 是重力加速度, ρ_p 为外泌体平均密度, ρ 为样品液体密度。综合公式(3)-(5),可知外泌体受热对流的黏性阻力与直径成正比。

[0064] 对比热泳力与热对流黏性阻力,可知物体越大,受到的热泳力越占主导,越倾向于聚集在样品室底面,也即本实施例装置中的第二导热面;物体越小,受到热对流黏性阻力越占主导,越倾向于跟随热对流而不聚集。因此,本发明通过热泳效应,使液体中的微纳粒子流动而聚集。当然,上述模型适用于所有微纳粒子,对微纳粒子的粒径也没有限定。

[0065] 继续参阅图1所示,信号放大单元3包括设置在所述样品仓室单元2的微纳粒子聚

积区域的显微镜,其包括对准聚积的微纳粒子的物镜31、反光镜32、以及观测光源33,通过显微镜更能清晰的观测微纳粒子。所述信号采集单元4为CCD相机,当然,也可以是任何能够探测光信号的仪器,通过显微镜对微纳粒子进行拍照,获取信息。

[0066] 在本实施例中,对外泌体信号检测而言,首先将外泌体样品与荧光标记的适体孵育,使荧光标记的适体与外泌体表面的靶蛋白特异性结合,从而将外泌体标记上荧光;将孵育后的外泌体样品放入样品室24,并通过激光加热引入热泳效应和对流,将样品室内的外泌体上标记的荧光信号放大;通过CCD记录激光照射前后的荧光信号,通过分析激光照射前后的荧光信号,得出外泌体表面靶蛋白的丰度;使用一系列能结合不同靶蛋白的适体,能够得出外泌体表面蛋白图谱,并通过该分析最终确定外泌体的相应指标参数。

[0067] 本实施例中,微纳粒子的检测方法包括:

[0068] 步骤a,从一侧对样品仓室单元2内的微纳粒子样品进行加热,在样品仓室单元2产生热泳效应,以将微纳粒子汇聚在所述样品仓室单元2内的低温一侧;

[0069] 在上述步骤a中,样品流体受热膨胀产生浮力从而在样品仓室单元2中产生对流,在样品仓室单元2的低温区域,对流的方向从周围指向样品仓室单元2的加热区域,将周围微纳粒子汇聚在样品仓室单元2的低温一侧。

[0070] 步骤b,通过对所述样品仓室单元2内的低温一侧聚积的微纳粒子,采集微纳粒子的相应指标信息并对相应指标进行分析。

[0071] 具体而言,本实施例对外泌体进行信号检测,结合图2所示,该过程为:

[0072] 步骤a1,将外泌体样品与荧光标记的适体孵育,使荧光标记的适体与外泌体表面的靶蛋白特异性结合,从而将外泌体标记上荧光;

[0073] 步骤a2,将孵育后的外泌体样品放入样品室,并通过激光加热引入热泳效应和对流,将外泌体汇聚在所述样品室内的低温一侧,以将样品室内的外泌体上标记的荧光信号放大;

[0074] 步骤a3,获取光照射前后的荧光信号,通过分析激光照射前后的荧光信号,得出外泌体表面靶蛋白的丰度;

[0075] 步骤a4,使用一系列能结合不同靶蛋白的适体,得出外泌体表面蛋白图谱。

[0076] 下面通过具体实施例对上述微纳粒子检测系统和方法进行说明。

[0077] 实施例1

[0078] 将外泌体样品与荧光标记的适体孵育,选择的适体是经体外筛选技术SELEX(指数富集配体系统进化)筛选出的能特异结合蛋白质或其他小分子物质的寡聚核苷酸片段,具体而言,荧光标记的适体为40碱基的单链DNA,在样品液体中的线团直径小于5纳米,而外泌体直径为30-150纳米;将特异性识别CD63蛋白的适体应用于A375细胞(人黑色素瘤细胞)培养基上清中的外泌体。通过标准手段可在适体端部修饰荧光基团,当适体与外泌体表面的靶蛋白之间的特异性相互作用时,外泌体标记了适体携带的荧光。本实施例的外泌体样品为细胞培养基上清,样品的孵育条件均为:2小时孵育时间、适体浓度0.1微摩尔每升、孵育温度室温。

[0079] 其中,激光器采用1480nm波长的红外激光用于样品加热,功率为200毫瓦,焦点出激光光斑直径约200微米。因样品液体一般主要成分为水,水对1480nm波段附近有一个吸收峰,本领域技术人员可以理解的是,加热方式并不仅限于激光照射,波长也不仅限于

1480nm,激光照射方向不限于从上向下照射,功率的选择取决于照射方向,光点直径、波长等因素,不限于200毫瓦。在本实施例中,激光从上至下照射,样品室的上导热面采用明材质,如玻璃、PMMA、PDMS,下导热面采用导热性更好的蓝宝石,在底面形成低温区使外泌体热泳汇聚于底面。上导热面的厚度为1mm,下导热面的厚度为1mm,中间垫片以及样品室的高度均为240mm。

[0080] 按照上述基于外泌体的信号检测方法进行操作,当适体识别外泌体表面蛋白并与之结合时,适体上的荧光标记跟随外泌体被汇聚于激光光点下方的样品室底部区域,并产生增强荧光信号;当适体未识别外泌体表面蛋白时,游离的适体由于尺寸小不能汇聚,信号不增强。结合图3所示,本实施例中,CD63蛋白广泛存在于各类细胞的外泌体表面,通过激光照射后,出现明显的荧光信号,表明A375细胞的外泌体表面具有CD63蛋白。

[0081] 采用荧光显微镜激发和接收与外泌体结合后的适体上标记的荧光信号,激发和接收荧光的波长与标记的荧光发光基团特性相关,本实施例中,发光基团Cy5激发/发射波长为649/666nm,荧光信号被与荧光显微镜连接的CCD记录。通过CCD记录激光照射前后的荧光信号,通过分析激光照射前后的荧光信号,得出外泌体表面靶蛋白的丰度。

[0082] 实施例2

[0083] 本实施例,采用宫颈癌患者血清样品,使用7种不同的适体对血清样品中外泌体7种表面蛋白(CD63、PTK7、EpCAM、HepG2、HER2、PSA、CA125)的丰度进行检测,并与健康人血清样品进行对比。

[0084] 采用的外泌体操作方法,以及激光器、样品室及显微镜和CCD相机均相同。

[0085] 结合图4所示,可知此宫颈癌患者血清外泌体高表达CD63蛋白,和癌症相关标志物PTK7、EpCAM、HepG2、HER2、PSA以及CA125,其中CA125可作为传统的宫颈癌的标志物,也有部分宫颈癌患者存在HER2高表达。一般认为肿瘤标志物PTK7、EpCAM与多种癌症相关,HepG2主要针对肝癌有特异性,PSA主要针对前列腺癌有特异性。但这些肿瘤标志物并不是与某种癌症具有严格的对应相关关系。但由于肿瘤在生长或者癌症向其他器官转移过程中,经过多次分裂增殖,细胞不断产生基因突变,呈现出分子生物学或基因方面的改变但,所以这些肿瘤标志物并不是与某种癌症具有严格的对应相关关系。本实施例中此宫颈癌患者血清中检测出PTK7、EpCAM、HepG2,体现了此方法在捕获肿瘤基因突变或转移的潜力。此外CD63作为外泌体普遍表达的蛋白,在癌症患者外泌体的表达也高于健康人的,与已有传统检测方法得到的结果相符。

[0086] 进一步将本方法运用于大量真实临床血清样品,包含3例宫颈癌、2例卵巢癌、2例淋巴瘤、2例乳腺癌以及2例健康人。结合图5所示,本方法能够检测出各类癌症患者与健康人的血清外泌体的各类蛋白表达量的区别。对不同种类癌症之间,血清外泌体蛋白表达量的区别,主要表现在HER2在乳腺癌和宫颈癌中表达较高,CA125在卵巢癌和宫颈癌中表达较高,PSA在所检测的癌症种类中均不表达,EpCAM和PTK7和CD63在多种癌症中具有较高表达。这些结果均与已有方法检测结果相符。

[0087] 说明本方法能够灵敏地探测到癌症患者血清与健康人血清中的外泌体表面蛋白,包括癌症标志物的表达量的区别。并且表明以外泌体作为癌症肿瘤标记物的检测方法更为方便、灵敏、有效;传统癌症筛查或体检检测的肿瘤标记物种类有限(受限于可用的昂贵抗体和试剂)且灵敏度不高而导致假阴性,即患者未检测到标记物,例如,本实施例中宫颈癌

患者静脉血检测报告中CA125表达结果为在正常范围值内。而本方法无需昂贵抗体,根据检测需要可使用能与相应肿瘤标志物的蛋白特异性结合的适体即可。

[0088] 实施例3

[0089] 本实施例,采用的微纳粒子为非生物微纳粒子,具体为荧光聚苯乙烯微球,品牌为Thermofisher,直径为50至200纳米,质量分数为0.001%,溶于含0.02%的Tween20的水溶液中。激光器、样品室及显微镜和CCD相机均与上述实施例1、2相同。

[0090] 结合下图5所示,所有不同直径的荧光微球均高度汇聚于激光光点处,且根据荧光测量灰度值与荧光图片可见汇聚程度与荧光强度均随着颗粒直径增大而增强,与本实施例工作原理相符,即大颗粒更倾向于汇聚。本实施例说明无论是生物还是非生物的微纳粒子,均适用于本技术方案的构思。

[0091] 实施例4

[0092] 本实施例微纳粒子为游离蛋白、核酸等生物大分子或者外泌体未暴露在表面的蛋白、核酸等生物大分子,采用上述各实施例的热泳效应不能直接聚积游离态的生物大分子,因此,本实施例的机理在于,在微米尺寸的球体表面修饰能与目标蛋白、核酸特异性结合的抗体或适体,得到免疫微球,并将其与含有目标生物大分子的样品孵育并与目标生物大分子结合并标记荧光。通过上述热泳作用将微球高度汇聚,使得目标生物大分子荧光信号高度放大,并通过荧光强弱检测其丰度。

[0093] 本实施例基于微球载体的粒子检测方法包括:

[0094] 步骤a11,制备免疫微球,将微球与抗体或适体共同孵育,使抗体或适体固定在微球表面,得到免疫微球;在该过程中,将多余的未与微球结合的抗体或适体洗去;在本实施例中,微球采用聚苯乙烯微球。

[0095] 步骤b11,将免疫微球与待检测样品进行孵育,待检测样品中的目标蛋白或核酸与免疫微球上的抗体或适体进行特异性结合,从而固定在免疫微球上;

[0096] 步骤c11,将上述步骤b11制得的结合有目标生物分子的免疫微球与携带荧光基团的抗体或适体结合,通过特异性识别,将免疫微球上的目标生物分子标记荧光;

[0097] 步骤d11,从一侧对样品仓室单元2内的结合有目标生物分子的免疫微球样品进行加热,在样品仓室单元2产生热泳效应,以将结合有目标生物分子的免疫微球汇聚在所述样品仓室单元2内的低温一侧,并由于荧光标记富集而使信号放大;在该过程中,通过产生热泳,由于目标生物分子被免疫微球捕获从而等效尺寸变大,被高度富集并信号放大,而非目标生物分子处于游离状态等效尺寸很小信号无法被放大。

[0098] 步骤e11,通过对所述样品仓室单元2内的低温一侧聚积的结合有目标生物分子的免疫微球,采集结合有目标生物分子的免疫微球的相应指标信息并对相应指标进行分析。在该过程中,获取光照射前后的荧光信号,通过分析激光照射前后的荧光信号,得出外泌体表面靶蛋白的丰度;使用一系列能结合不同靶蛋白的适体,得出外泌体表面蛋白图谱。

[0099] 本实例采用表面包被抗体的免疫微球捕获卵巢癌症患者全血中游离蛋白标志物,采用红外激光产生热泳对蛋白标志物荧光信号进行放大检测,并确定待测蛋白标志物的丰度,其结果与传统检测方法结果符合,为癌症检测提供分子信息。在本实施例中,针对卵巢癌,选取EpCAM、CA-125、CA19-9、CD24、HER2、MUC18、EGFR、CLDN3、CD45、CD41、D2-40作为蛋白标志物,将这些蛋白标志物对应的特异性抗体(从abcam公司购买)分别制成免疫微球,每种

抗体单独制备微球,专门针对一种标志物的检测。对于包被抗体免疫微球的制备有标准流程可参考,在此简要叙述:将直径1微米聚苯乙烯微球与5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的抗体在室温下孵育1小时,孵育后用超滤法除去多余未反应的抗体。在此微球的直径不限于1微米,只要尺寸达到热泳能够汇聚;材质不限于聚苯乙烯,只要能够成功将抗体附着并不影响抗体和待测蛋白标志物活性的材质均可使用,抗体浓度和孵育温度时间均不限于本实例所述具体数值,参考实际使用抗体品牌批次和具体实验条件而变化。

[0100] 本实施例,采用以上步骤制备了11种免疫微球,以分别检测上述11种标志物,将取患者血清1.1 μL 稀释100倍后均分11份,分别与11种免疫微球混合在室温下孵育1小时,将具有荧光标记的抗体与捕获待测蛋白标志物的微球进行孵育,对蛋白标志物进行荧光标记。并采用上述各实施例的检测系统进行检测。对10例卵巢癌患者和10例健康人重复上述步骤,测得20例血清样品中11种蛋白标志物表达量,参阅图7和图8所示。由于癌症的异质性,具体每例患者血清的标志物表达不完全相同,但总体上表达量明显高于健康样本。重要的是每种蛋白标志物作为单一癌症检测标准,准确率不高。采用11中蛋白表达量之和作为检测标准,测能够准确区分卵巢癌与健康样本。采用更多的有诊断意义的标志物将大大提高诊断准确率,但成本随标志物数量增长而上升,尤其针对某种标志物的抗体较为罕见昂贵。本实施例的检测方法,每种标志物每人仅需1ng抗体,成本不足1元,无需其他昂贵试剂。

[0101] 至此,已经结合附图所示的优选实施方式描述了本发明的技术方案,但是,本领域技术人员容易理解的是,本发明的保护范围显然不局限于这些具体实施方式。在不偏离本发明的原理的前提下,本领域技术人员可以对相关技术特征作出等同的更改或替换,这些更改或替换之后的技术方案都将落入本发明的保护范围之内。

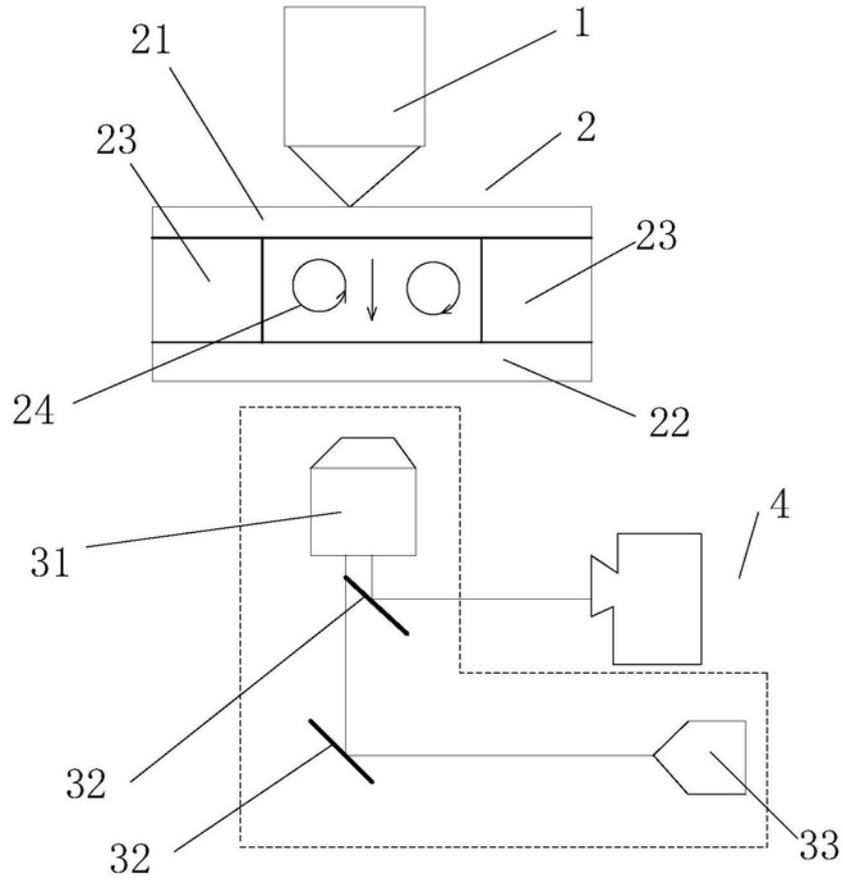


图1

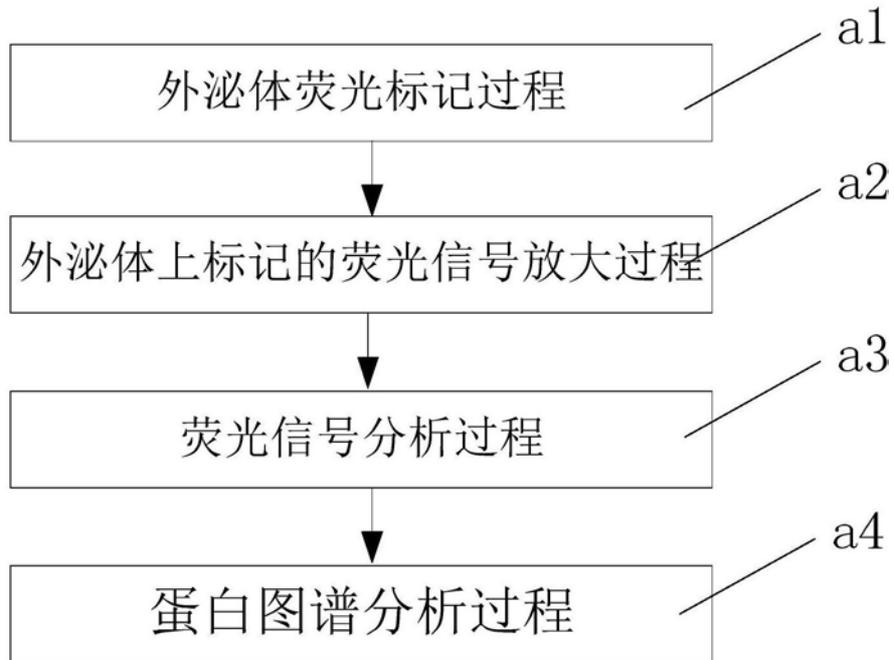


图2

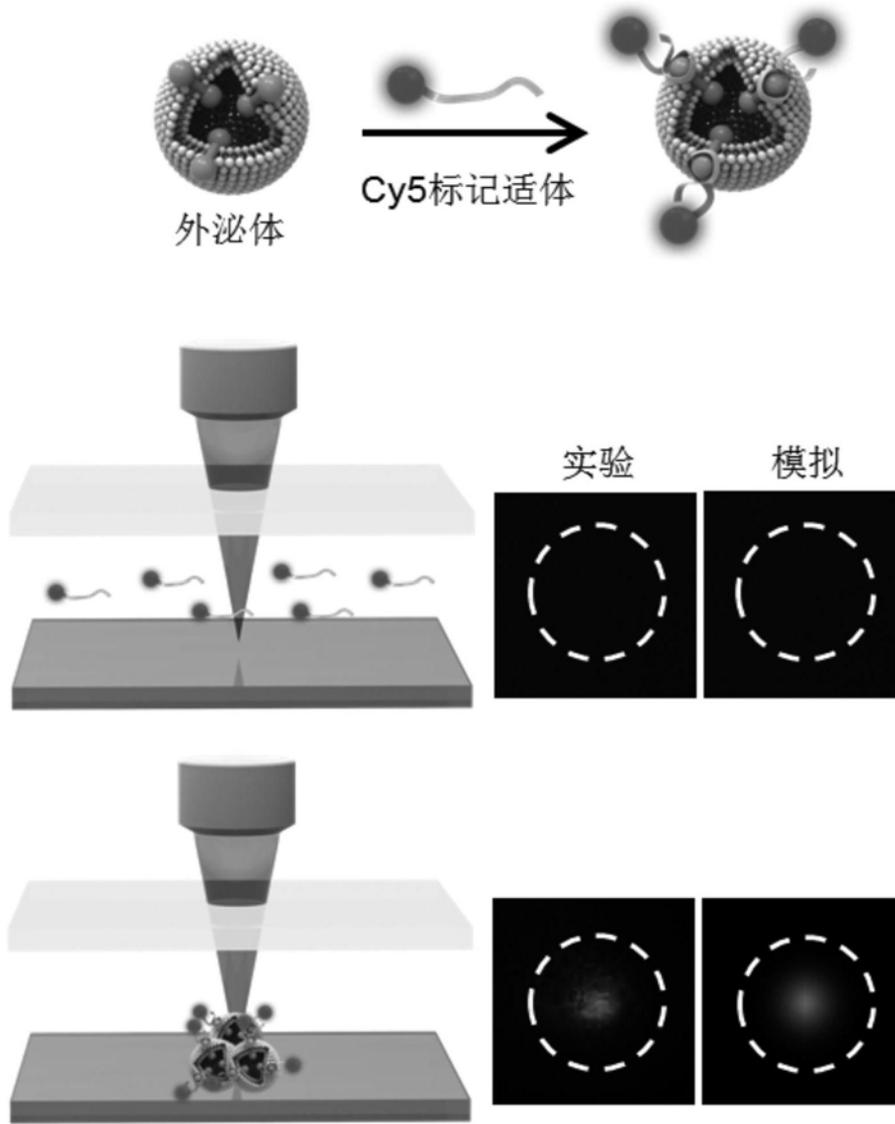


图3

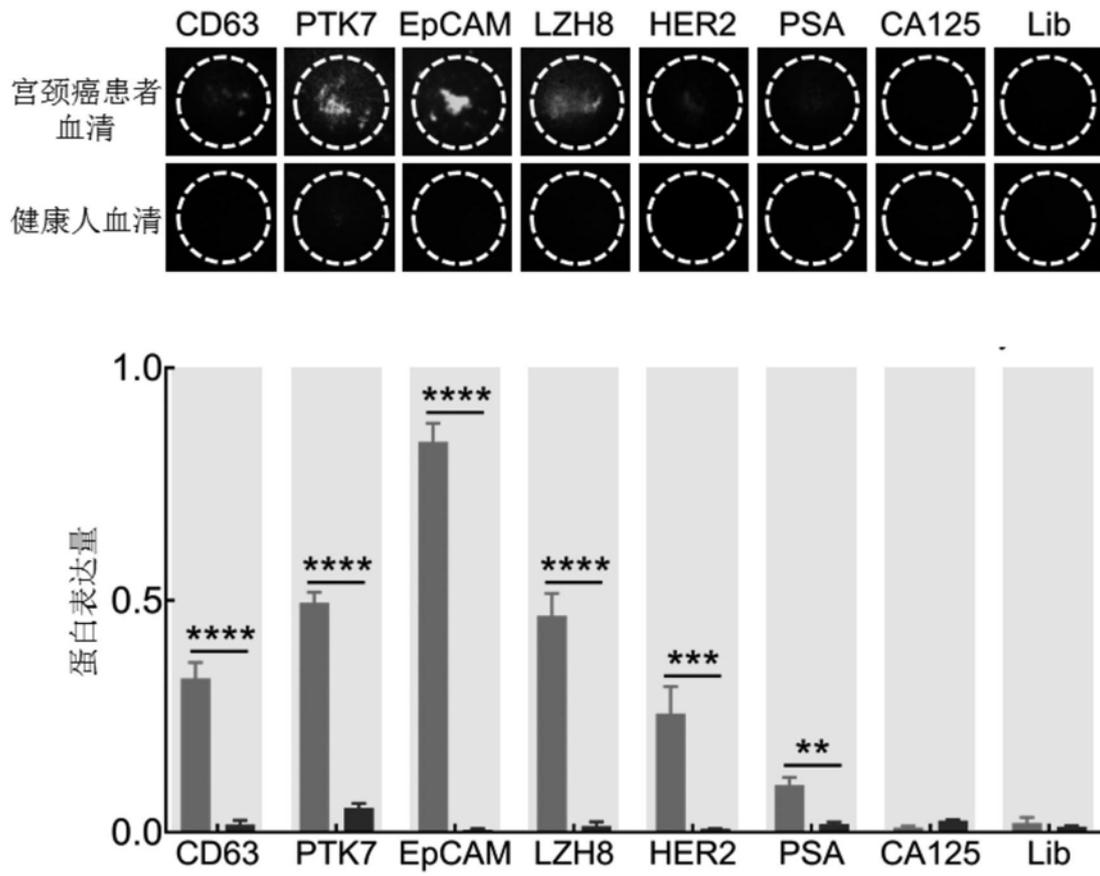


图4

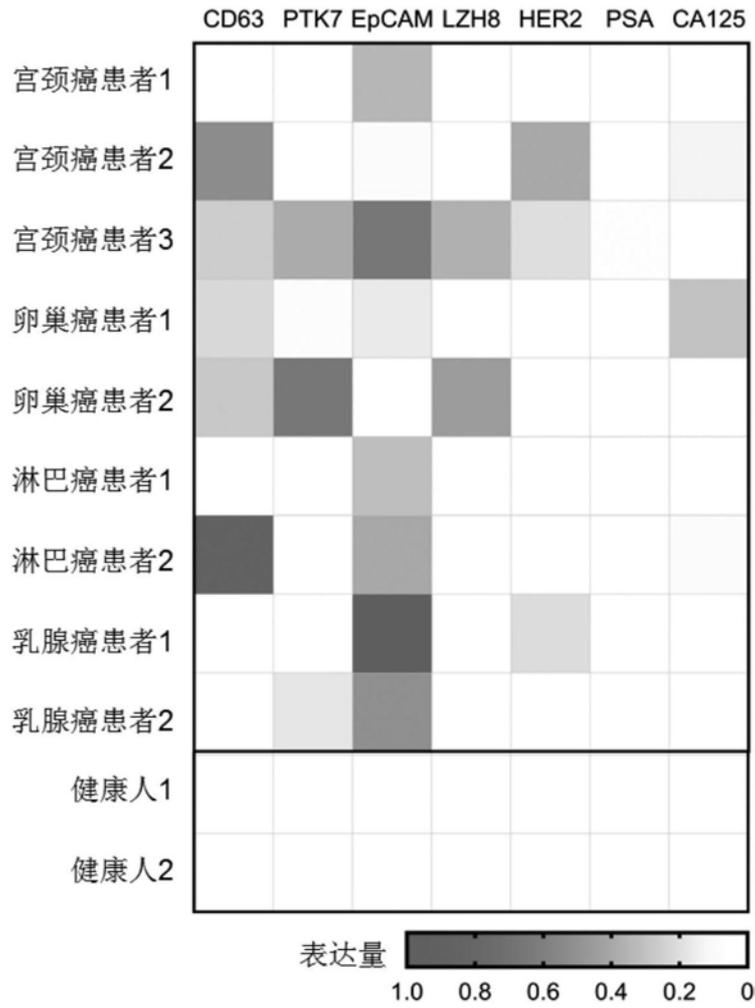


图5

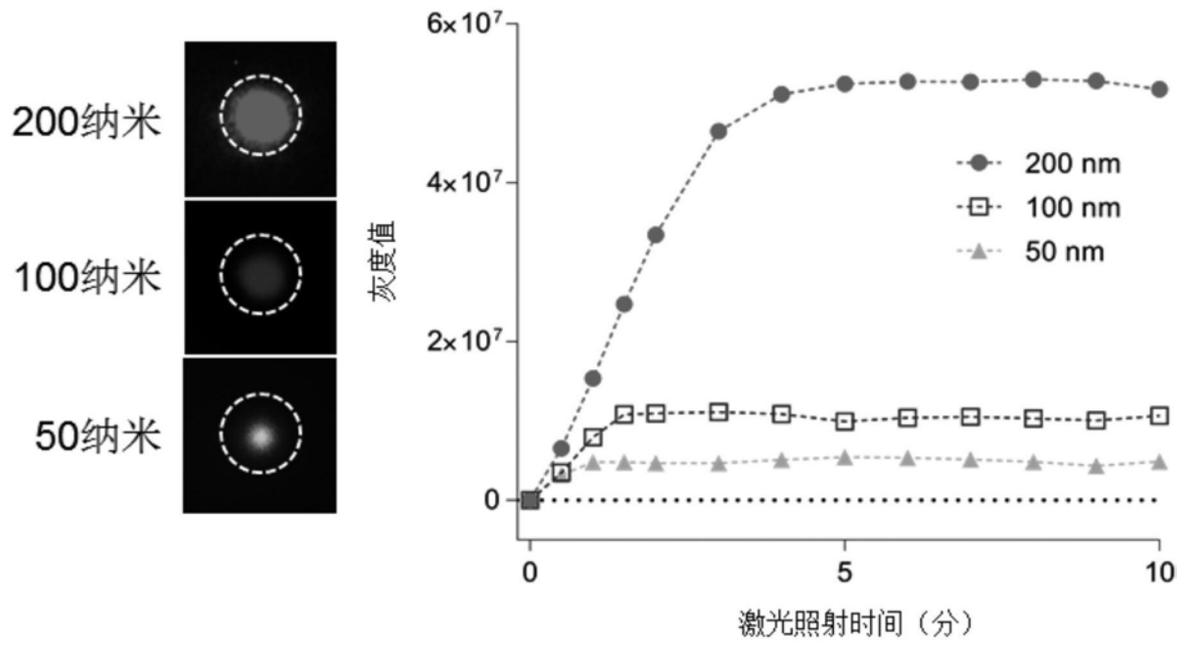


图6



图7

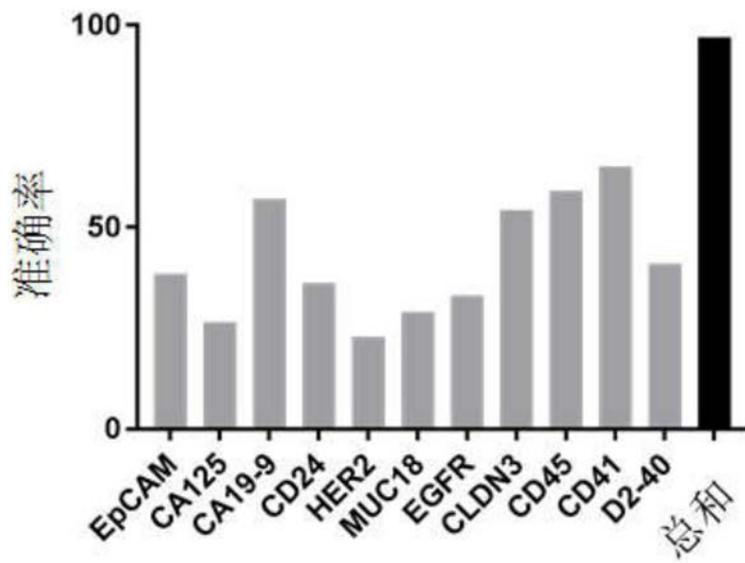


图8

专利名称(译)	基于微球载体的粒子检测系统及方法		
公开(公告)号	CN108593910A	公开(公告)日	2018-09-28
申请号	CN201810306124.0	申请日	2018-04-08
[标]申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
当前申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
[标]发明人	孙佳姝 刘超 田飞		
发明人	孙佳姝 刘超 田飞		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54313		
代理人(译)	张黎		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于微球载体的粒子检测系统及方法，本系统包括加热单元、样品仓室单元，其中，所述样品仓室单元内装载有结合有目标生物分子的免疫微球流体，所述免疫微球为抗体或适体固定在微球表面而制得，所述结合有目标生物分子的免疫微球采用荧光标记，在加热单元对所述样品仓室单元加热后，所述样品仓室单元内产生热泳效应，将所述外泌体汇聚在所述样品仓室单元内温度较低的一侧，以将样品室内的结合有目标生物分子的免疫微球上标记的荧光信号放大，以进行检测。本发明游离蛋白、核酸等生物大分子在微米尺寸的球体表面修饰能与目标蛋白、核酸特异性结合的抗体或适体，得到免疫微球，以对游离态的粒子进行汇聚，并在汇聚后进行检测。

