



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111323598 A

(43)申请公布日 2020.06.23

(21)申请号 201910376587.9

(22)申请日 2019.05.07

(71)申请人 北京益微生物科技有限公司
地址 100000 北京市海淀区永澄北路2号院
1号楼B座一层379号

(72)发明人 樊萌

(74)专利代理机构 北京超凡宏宇专利代理事务
所(特殊普通合伙) 11463
代理人 王焕

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

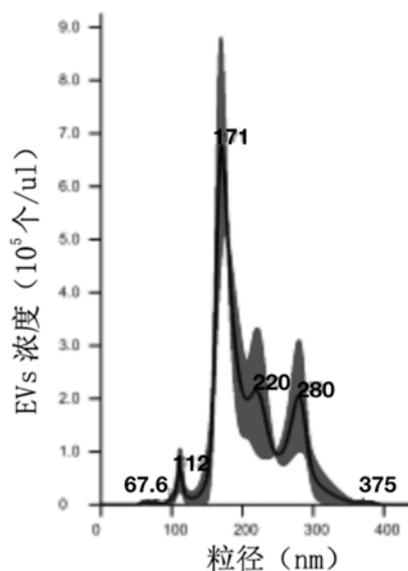
权利要求书3页 说明书14页 附图2页

(54)发明名称

检测细胞胞外囊泡的膜蛋白的方法

(57)摘要

本发明涉及生物检测领域,具体而言,涉及一种检测细胞胞外囊泡的膜蛋白的方法。该方法包括:a)将含有细胞胞外囊泡(EVs)的组合物与固相载体共孵育;所述固相载体包被有抗EVs的膜蛋白的第一抗体组;b)洗去非特异性结合的EVs及其它杂质;c)加入用于检测的第二抗体组进行信号检测;所述第二抗体组为EVs的生物标志物的抗体,且偶联有用于显示信号强度的标记物。该方法操作简便,可根据情况灵活调整检测通量,灵敏度高。



1. 检测细胞胞外囊泡的膜蛋白的方法,其特征在于,包括:

a) 将含有细胞胞外囊泡(EVs)的组合物与固相载体共孵育;所述固相载体包被有抗EVs的膜蛋白的第一抗体组;

b) 洗去非特异性结合的EVs及其它杂质;

c) 加入用于检测的第二抗体组进行信号检测;所述第二抗体组为EVs的生物标志物的抗体,且偶联有用于显示信号强度的标记物。

2. 权利要求1所述的方法,其特征在于,其中所述组合物来源于人类;

优选的,所述组合物衍生自肿瘤细胞或病原体感染的细胞;

优选的,所述组合物选自细胞培养物上清液、全血、血清、血浆、腹水、脑脊液、骨髓穿刺液、支气管肺泡洗液、尿、精液、阴道分泌物、黏液、唾液、痰或者从生物组织样品得到的澄清的裂解液。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述组合物在基本上不破坏EVs形态学特征或功能特征或者细胞表面抗原的条件下被分离。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述组合物为经过如下处理的细胞培养物上清液:

1) 250~350g离心8~12min,收集上清;

2) 2500~3500g离心8~12min,收集上清;

3) 8000~12000g离心25~35min,收集上清;

4) 用80~120KD超滤离心管进行浓缩。

5. 根据权利要求1、2、4任一项所述的方法,其特征在于,所述组合物中EVs的浓度为 $10^5 \sim 10^8$ 个/ μl 。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述第一抗体组选自下列蛋白的抗体:

ACP1, ACVR1B, ACVR2A, ACVR2B, ACVRL1, ADA, ADAM15, ADGRD1, AGER, AIF1, AK2, AKT1, ALOX5AP, ALPI, ALPL, AMIGO2, ANPEP, APLP1, APP, ARG1, ARL2BP, ART3, ASGR1, ASGR2, ATF2, ATL3, ATP1B4, ATP5D, AXL, BACE1, BAMBI, BCAM, BCL2, BCL2L1, BCL2L2, BIN2, BLNK, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, BNIP3L, BPI, BSG, BST1, BST2, BTN3A3, BVES, C1QBP, CA12, CA14, CA2, CA4, CA9, CADM1, CADM3, CAMKV, CD14, CD164, CD177, CD19, CD2, CD200, CD200R1L, CD22, CD226, CD244, CD247, CD27, CD274, CD276, CD28, CD300A, CD300C, CD300LG, CD33, CD34, CD36, CD38, CD3D, CD3E, CD4, CD40, CD40LG, CD44, CD46, CD47, CD48, CD5, CD55, CD58, CD59, CD63, CD68, CD69, CD7CD74, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD86, CD8A, CD93, CD96, CDC42, CDC42BPB, CDH1, CDH12, CDH16, CDH17, CDH2, CDH4, CDH5, CDH6, CDH8, CDK4, CDON, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM8, CFL1, CHL1, CHRNB3, CIB2, CKMT1A, CLEC1B, CLEC4A, CLEC4D, CLIC4, CLMP, CLSTN1, CLTRN, CNTN1, CNTN2, CNTN3, CNTN5, COQ7, COX5B, CPE, CPLX3, CPM, CR2, CREB3L1, CRELD1, CRTAM, CSF1, CSF1R, CSF2RB, CTLA4, CTNNA1, CX3CL1, DCBLD2, DCXR, DDOST, DDR2, DHRS9, DLL1, DLL4, DMBT1, DPEP1, DPEP2, DPP10, DSC2, EBAG9, ECE1, EDA2R, EDAR, EFNA1, EFNA3, EFNA5, EFNB1, EFNB2, EGF, EGFR, EIF5A2, ENG, ENO1, ENPP5, ENPP7, ENTPD3, EpCAM, EPHA1, EphA2, EphA4, EphB2, EphB3, EphB4, EphB6, EPOR, ERBB3, ERN1, ESAM, EZR, F11R, F3, FAM171B, FCER1A, FCER2, FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A, FCGR3B, FCRL1, FCRL2, FES, FGF1, FGF2, FGFR1, FLRT1, FLRT2, FLRT3, FLT3, FLT3LG, FLT4, FOLH1, FOLR2, FUT10, GALNT2,

GALNT7, GAPDH, GBP2, GFER, GFRA2, GFRA3, GGT5, GLT8D2, GNG13, GNGT1, GOLM1, GOPC, GPA33, GPIHBP1, GPNMB, GPR37, GRK5, GUCA1A, GYPA, GYPC, HAVCR1, HAVCR2, HJV, HRAS, HSPA1A, HTRA2, ICAM1, ICAM2, ICAM3, ICAM5, ICOSLG, IFNAR1, IFNGR1, IGF1R, IGSF11, IGSF3, IGSF8, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL13Ra1, IL13Ra2, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RD, IL18R1, IL18RAP, IL1R1, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RL1, IL20RA, IL21R, IL2RA, IL2RG, IL31RA, IL3Ra, IL4R, IL6R, IL6ST, INSR, ITCH, IZUMO1, JAML, KCNIP3, KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL4, KIRREL2, KLK7, KLRC1, KLRK1, KREMEN1, L1CAM, LAMP1, LAMP2, LAMP3, LAYN, Lck, LEPR, LIFR, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LMAN2, LOXL2, LRP10, LRP11, LRRC3B, LRRN3, LTA, LTC4S, LXN, LY75, LYPD3, MAP1LC3B, MAPK9, MAPT, MCAM, MEP1A, MEP1B, MERTK, MET, MICA, MICB, MME, MMP2, MOB4, MOG, MS4A1, MSN, MSR1, MST1R, MUC1, NAALADL1, NAPA, NCAM2, NCKIPSD, NCR3, NCR3LG1, NCSTN, NDRG1, NECTIN3, NLGN1, NLGN3, NLGN4X, NPC1, NPTN, NRAS, NRG1, NRG3, NRG4, NRP1, NRP2, NRXN3, NT5E, NTNG1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, OLFM4, OLR1, OMG, OPTN, OSMR, OSTM1, P4HB, PARK7, PARM1, PARVA, PDCD1, PDCD1LG2, PDE2A, PDGFC, PDGFRA, PDGFRB, PECAM1, PGD, PIGR, PLAUR, PPM1A, PRKAR1A, PRLR, PROCR, PTGDS, PTH1R, PTP4A2, PTPMT1, PTPN1, PTPRC, PTPRJ, RAB11B, RAB27B, RAB31, RAB6A, RAC1, RAET1E, RAET1L, RELT, REN, RET, RGMA, RHOA, RNF43, ROM1, RTN4, RUVBL1, S100A12, S100A6, S100A8, S100A9, S100P, SCGN, SCN2B, SDC1, SDC3, SECTM1, SELE, SELL, SELP, SELPLG, SEMA4A, SEMA4D, SEMA6A, SerpinA5, SFRP1, SIGIRR, SIRPA, SIRPG, SIRT1, SLAMF1, SLAMF6, SLAMF7, SLC27A4, SLC3A2, SLITRK1, SLITRK4, SLITRK6, SNAP25, SNCA, SPARC, SPINT2, ST6GAL1, STIM1, STK10, STXB1, SUMO1, SYT6, TACSTD2, TDGF1, TEK, TFRC, TGFBR1, TGFBR2, THY1, Tie1, TIMD4, TLR4, TMEM156, TMIGD1, TMIGD2, TMUB2, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10D, TNFRSF11A, TNFRSF13B, TNFRSF14, TNFRSF17, TNFRSF18, TNFRSF19, TNFRSF1A, TNFRSF21, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFSF10, TNFSF13B, TPO, TREM1, TREML1, TREML2, TSPAN1, TSPAN7, TYRP1, UCHL1, ULBP2, UNC5A, USP30, VAPB, VASN, VCAM1, VLDLR, VNN2, VSIG2, VSIG4, VSTM1, VTCN1, VWC2, XPNPEP2;

优选地,所述第一抗体组中的抗体以每种抗体180~220 μ g/ml的浓度包被在所述固相载体上;

优选地,所述固相载体还包被有阳性对照抗体;

所述阳性对照为标记有所述用于显示信号强度的标记物,且与所述第二抗体组为同型对照抗体;

优选的,所述阳性对照抗体按照浓度梯度设置于多个孔内;

优选地,所述固相载体还设置有阴性对照孔;

所述阴性对照孔中仅添加孵育缓冲液;

优选地,其特征在于,所述第二抗体组为CD9、CD63和CD81;

优选地,其特征在于,所述标记物选自荧光物质、量子点、地高辛标记探针、生物素、放射性同位素、放射性造影剂、顺磁离子荧光微球、电子致密物质、化学发光标记物、超声造影剂、光敏剂、胶体金或酶中的任一种;

优选地,所述固相载体为玻片或膜式基片;

优选地,所述固相载体被高分子所修饰,或表面涂有高分子膜;

优选地,所述高分子选自氨基、醛基、环氧树脂、巯基、聚糖;

优选地,所述高分子膜选自聚乙烯醇薄膜、琼脂糖薄膜或聚乙烯醇-琼脂糖复合薄;

优选地,所述固相载体还具有聚二甲基硅氧烷、聚乙烯或聚乙二醇衍生物涂层。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法还包括:分析EVs的粒径特征和/或浓度特征;

优选地,所述分析以纳米颗粒跟踪分析技术进行;

优选地,所述方法还包括,将EVs从所述固相载体洗脱下来,所用的洗脱液为80mM~120mM,pH2.2~2.6的glycine-HCl溶液。

8. 权利要求1~7任一项中所提及的第一抗体组。

9. 权利要求1~7任一项中所提及的固相载体。

10. 试剂盒,其含有权利要求1~7任一项中所提及的固相载体以及第二抗体组。

检测细胞胞外囊泡的膜蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,具体而言,涉及一种检测细胞胞外囊泡的膜蛋白的方法。

背景技术

[0002] 细胞胞外囊泡 (Extracellular vesicles, EVs) 是由细胞分泌到细胞外的20-1000nm大小的膜囊泡结构群体,广泛分布于细胞培养上清以及各种体液(血液、尿液、唾液等)。EVs主要由蛋白质,核酸以及磷脂分子组成,作为细胞与细胞间遗传物质与信息的传递者 [Colombo M, Raposo G, Théry, Clotilde. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2014, 30 (1) : 255-289.]。

[0003] EVs发挥着重要的生物学功能,参与调控各种生物学进程以及疾病过程,例如肿瘤、神经性疾病、心血管疾病和组织损伤修复等。并且EVs在疾病诊断以及疾病治疗方面具有广泛的应用前景,可以作为疾病诊断的生物标志物和药物载体,尤其EVs可以作为早期肿瘤的标志物 [Stremersch S, De Smedt S C, Raemdonck K. Therapeutic and diagnostic applications of extracellular vesicles [J]. Journal of Controlled Release, 2016: S0168365916305004.]。因此, EVs的分子调控机制及其功能研究具有重要的理论和实用意义。

[0004] 阐述EVs的分子调控机制及其功能的关键在于EVs膜蛋白组成的研究。因为EVs膜蛋白组成决定着EVs的来源及其作用于下游细胞的靶向性。并且EVs膜蛋白也是非常重要的疾病诊断标志物以及靶点。例如,表达GPC1膜蛋白的EVs能够作为早期胰腺癌的诊断标志物 [Melo S A, Luecke L B, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer [J]. Nature, 2015, 523 (7559) : 177-182.]。表达CD47膜蛋白的EVs能够增强EVs作为药物载体治疗胰腺癌的传递和吸收效率 [Kamerkar S, Lebleu V S, Sugimoto H, et al. Exosomes Facilitate Therapeutic Targeting of Oncogenic Kras in Pancreatic Cancer [J]. Nature, 2017, 546 (7659) : 498-503.]。综上, EVs膜蛋白组成的研究,有助于阐述EVs的分子调控机制及其功能,从而推动EVs作为疾病诊断标志物以及疾病治疗的应用。

[0005] 现有的EVs膜蛋白组成研究方法需要经过EVs的分离,提取EVs蛋白,然后进行蛋白质组成的检测。如通过传统的EVs分离技术(超速离心、过滤离心等方法)实现EVs的分离,然后结合蛋白质检测方法(蛋白免疫印迹,蛋白质质谱等方法)进行EVs蛋白质的组成分析。上述传统的EVs分离和蛋白检测方法都存在着其局限性:EVs分离需要的样本量大,操作繁琐,耗时长;而且很难实现EVs膜蛋白的高通量检测。如蛋白免疫印迹一次实验只能检测一种膜蛋白,存在操作繁琐、检测通量低、灵敏度低的缺点。蛋白质质谱技术,对蛋白纯度要求较高,而EVs的传统分离方法常常会引入杂蛋白质污染。因此,有必要开发一种新型的EVs分离和EVs膜蛋白检测方法,以克服现有技术中待解决的问题。

[0006] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种检测细胞胞外囊泡的膜蛋白的方法,其包括:

[0008] a) 将含有细胞胞外囊泡 (EVs) 的组合物与固相载体共孵育;所述固相载体包被有抗EVs的膜蛋白的第一抗体组;

[0009] b) 洗去非特异性结合的EVs及其它杂质;

[0010] c) 加入用于检测的第二抗体组进行信号检测;所述第二抗体组为EVs的生物标志物的抗体,且偶联有用于显示信号强度的标记物。

[0011] 该方法操作简便,可根据情况灵活调整检测通量,灵敏度高。

[0012] 本发明还涉及上述所提及的第一抗体组。

[0013] 本发明还涉及上述所提及的固相载体。

[0014] 本发明还涉及试剂盒,其含有上述所提及的固相载体以及第二抗体组。

附图说明

[0015] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0016] 图1为本发明实施例2所述的前处理样本中的EVs浓度检测结果;

[0017] 图2为本发明实施例3所述的抗体芯片结果扫描图像;

[0018] 图3为本发明实施例4所述的被捕获的EVs粒径与浓度特征鉴定图。

具体实施方式

[0019] 根据本发明的一方面,本发明涉及一种检测细胞胞外囊泡的膜蛋白的方法,其包括:

[0020] a) 将含有细胞胞外囊泡 (EVs) 的组合物与固相载体共孵育;所述固相载体包被有抗EVs的膜蛋白的第一抗体组;

[0021] b) 洗去非特异性结合的EVs及其它杂质;

[0022] c) 加入用于检测的第二抗体组进行信号检测;所述第二抗体组为EVs的生物标志物的抗体,且偶联有用于显示信号强度的标记物。

[0023] 所述方法包括诊断及非诊断目的。

[0024] 在本发明中,细胞胞外囊泡 (Extracellular vesicles, EVs) 被定义为20-1000nm大小的膜囊泡结构群体,其可包括外泌体 (exosomes)、微泡 (microvesicles) 和凋亡小体 (apoptosis body) 等。

[0025] 由于细胞胞外囊泡存在于原核生物和真核生物中,并且跨越所有的进化,所以本发明可以使用得自原核生物、真核生物、细菌、真菌、酵母、无脊椎动物、脊椎动物、爬行动物、鱼、昆虫、植物或动物 (包括哺乳动物,例如啮齿动物和灵长目动物) 的任何组合物。例如组合物来源可以为鸡、小鼠、大鼠、兔、山羊、羔羊、绵羊、马、猪、牛 (胎牛) 和人类。组合物的

优选的实例为鼠、牛或人类,其用于制备分别为鼠、牛或人类的细胞胞外囊泡;更优选的,所述组合物来源于人类。

[0026] 在一些实施方式中,所述组合物衍生自肿瘤细胞或病原体感染的细胞。

[0027] 示例性肿瘤包括但不限于肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、胰腺癌、喉癌、食道癌、睾丸癌、肝癌、腮腺癌、胆道癌、结肠癌、直肠癌、子宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、甲状腺癌、鳞状细胞癌、腺癌、小细胞癌、黑素瘤、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、成神经细胞瘤等。从这些实例中,通常使用得自黑素瘤、结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、肝癌、前列腺癌、乳腺癌和卵巢癌样品。

[0028] 示例性的病原体包括但不限于病毒、细菌、寄生虫、真菌。

[0029] 病原体的概念还可以理解为具有致病性/激活免疫功能的有机大分子,有机小分子,或无机分子。

[0030] 在一些实施方式中,所述组合物选自细胞培养物上清液、全血、血清、血浆、腹水、脑脊液、骨髓穿刺液、支气管肺泡洗液、尿、精液、阴道分泌物、黏液、唾液、痰或者从生物组织样品得到的澄清的裂解液。

[0031] 所述组合物可以是新鲜的或事先冷冻的,然后解冻。

[0032] 在一些实施方式中,所述组合物在基本上不破坏EVs形态学特征或功能特征或者细胞表面抗原的条件下被分离;

[0033] 上述,EVs在所述组合物中应该保持了它们的原始抗原图谱,这样它们是“抗原性完整的”,由此被检测的EVs才能用以分析其浓度/粒径。

[0034] EVs的富集方式可通过密度梯度离心、超速离心、超滤、聚乙二醇沉淀和试剂盒提取等进行;在一些实施方式中,所述组合物为经过如下处理的细胞培养物上清液:

[0035] 1) 250~350g离心8~12min,收集上清;

[0036] 2) 2500~3500g离心8~12min,收集上清;

[0037] 3) 8000~12000g离心25~35min,收集上清;

[0038] 4) 用80~120KD超滤离心管进行浓缩。

[0039] 在一些实施方式中,所述组合物为经过如下处理的细胞培养物上清液:

[0040] 1) 270~330g离心9~11min,收集上清;

[0041] 2) 2700~3300g离心9~11min,收集上清;

[0042] 3) 9000~11000g离心27~33min,收集上清;

[0043] 4) 用90~110KD超滤离心管进行浓缩。

[0044] 在一些实施方式中,所述组合物为经过如下处理的细胞培养物上清液:

[0045] 1) 290~310g离心10min,收集上清;

[0046] 2) 2900~3100g离心10min,收集上清;

[0047] 3) 9500~10500g离心10min,收集上清;

[0048] 4) 用100KD超滤离心管进行浓缩。

[0049] 在一些实施方式中,上述离心和浓缩操作均在基本上不影响膜蛋白检测的低温环境下进行,例如0°C~8°C,优选4°C。

[0050] 在本发明所提供的实施方案中,经过纯化后,所述组合物的特定群体的制备“基本上不具有”其他的成分。例如基本上不具有非疾病相关的(例如得自正常细胞)的EVs,例如

外来体;在所有此类的内容中,“基本上不具有”和“实质上不具有”其他列举成分的组合物用于指这样的组合物,其基本上不具有其他列举的成分,使得其他列举的成分在实质上对组合物不具有实质的作用,直至并包括无可检测的作用,这可以例如在针对此类其他列举的成分进行标准的定量或优选的功能测定法中进行测量。换言之,其他列举的成分不会实质上、或者甚至可测量地干扰组合物的功能,或者以其他方式导致任何意外的反映、性质或其中的缺陷,这可以例如在针对组合物的活性成分进行标准的定量或优选的功能测定法中进行测量。

[0051] 在一些实施方式中,所述组合物中EVs的浓度为 $10^5\sim 10^8$ 个/ μl 。

[0052] 在一些实施方式中,所述组合物中EVs的浓度为 10^6 个/ μl 或 10^7 个/ μl

[0053] 在一些实施方式中,所述第一抗体组选自下列蛋白的抗体:

[0054] ACP1, ACVR1B, ACVR2A, ACVR2B, ACVRL1, ADA, ADAM15, ADGRD1, AGER, AIF1, AK2, AKT1, ALOX5AP, ALPI, ALPL, AMIGO2, ANPEP, APLP1, APP, ARG1, ARL2BP, ART3, ASGR1, ASGR2, ATF2, ATL3, ATP1B4, ATP5D, AXL, BACE1, BAMBI, BCAM, BCL2, BCL2L1, BCL2L2, BIN2, BLNK, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, BNIP3L, BPI, BSG, BST1, BST2, BTN3A3, BVES, C1QBP, CA12, CA14, CA2, CA4, CA9, CADM1, CADM3, CAMKV, CD14, CD164, CD177, CD19, CD2, CD200, CD200R1L, CD22, CD226, CD244, CD247, CD27, CD274, CD276, CD28, CD300A, CD300C, CD300LG, CD33, CD34, CD36, CD38, CD3D, CD3E, CD4, CD40, CD40LG, CD44, CD46, CD47, CD48, CD5, CD55, CD58, CD59, CD63, CD68, CD69, CD7CD74, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD86, CD8A, CD93, CD96, CDC42, CDC42BPB, CDH1, CDH12, CDH16, CDH17, CDH2, CDH4, CDH5, CDH6, CDH8, CDK4, CDON, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM8, CFL1, CHL1, CHRN3, CIB2, CKMT1A, CLEC1B, CLEC4A, CLEC4D, CLIC4, CLMP, CLSTN1, CLTRN, CNTN1, CNTN2, CNTN3, CNTN5, COQ7, COX5B, CPE, CPLX3, CPM, CR2, CREB3L1, CRELD1, CRTAM, CSF1, CSF1R, CSF2RB, CTLA4, CTNNA1, CX3CL1, DCBLD2, DCXR, DDOST, DDR2, DHRS9, DLL1, DLL4, DMBT1, DPEP1, DPEP2, DPP10, DSC2, EBAG9, ECE1, EDA2R, EDAR, EFNA1, EFNA3, EFNA5, EFNB1, EFNB2, EGF, EGFR, EIF5A2, ENG, ENO1, ENPP5, ENPP7, ENTPD3, EpCAM, EPHA1, EphA2, EphA4, EphB2, EphB3, EphB4, EphB6, EPOR, ERBB3, ERN1, ESAM, EZR, F11R, F3, FAM171B, FCER1A, FCER2, FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A, FCGR3B, FCRL1, FCRL2, FES, FGF1, FGF2, FGFR1, FLRT1, FLRT2, FLRT3, FLT3, FLT3LG, FLT4, FOLH1, FOLR2, FUT10, GALNT2, GALNT7, GAPDH, GBP2, GFER, GFRA2, GFRA3, GGT5, GLT8D2, GNG13, GNGT1, GOLM1, GOPC, GPA33, GPIHBP1, GPNMB, GPR37, GRK5, GUCA1A, GYPA, GYPC, HAVCR1, HAVCR2, HJV, HRAS, HSPA1A, HTRA2, ICAM1, ICAM2, ICAM3, ICAM5, ICOSLG, IFNAR1, IFNGR1, IGF1R, IGSF11, IGSF3, IGSF8, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL13Ra1, IL13Ra2, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RD, IL18R1, IL18RAP, IL1R1, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RL1, IL20RA, IL21R, IL2RA, IL2RG, IL31RA, IL3Ra, IL4R, IL6R, IL6ST, INSR, ITCH, IZUM01, JAML, KCNIP3, KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL4, KIRREL2, KLK7, KLRC1, KLRK1, KREMEN1, L1CAM, LAMP1, LAMP2, LAMP3, LAYN, Lck, LEPR, LIFR, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LMAN2, LOXL2, LRP10, LRP11, LRRC3B, LRRN3, LTA, LTC4S, LXN, LY75, LYPD3, MAP1LC3B, MAPK9, MAPT, MCAM, MEP1A, MEP1B, MERTK, MET, MICA, MICB, MME, MMP2, MOB4, MOG, MS4A1, MSN, MSR1, MST1R, MUC1, NAALADL1, NAPA, NCAM2, NCKIPSD, NCR3, NCR3LG1, NCSTN, NDRG1, NECTIN3, NLGN1, NLGN3, NLGN4X, NPC1, NPTN, NRAS, NRG1, NRG3, NRG4, NRP1, NRP2, NRXN3, NT5E, NTNG1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, OLFM4, OLR1, OMG, OPTN, OSMR,

OSTM1, P4HB, PARK7, PARM1, PARVA, PDCD1, PDCD1LG2, PDE2A, PDGFC, PDGFRA, PDGFRB, PECAM1, PGD, PIGR, PLAUR, PPM1A, PRKAR1A, PRLR, PROCR, PTGDS, PTH1R, PTP4A2, PTPMT1, PTPN1, PTPRC, PTPRJ, RAB11B, RAB27B, RAB31, RAB6A, RAC1, RAET1E, RAET1L, RELT, REN, RET, RGMA, RHOA, RNF43, ROM1, RTN4, RUVBL1, S100A12, S100A6, S100A8, S100A9, S100P, SCGN, SCN2B, SDC1, SDC3, SECTM1, SELE, SELL, SELP, SELPLG, SEMA4A, SEMA4D, SEMA6A, SerpinA5, SFRP1, SIGIRR, SIRPA, SIRPG, SIRT1, SLAMF1, SLAMF6, SLAMF7, SLC27A4, SLC3A2, SLITRK1, SLITRK4, SLITRK6, SNAP25, SNCA, SPARC, SPINT2, ST6GAL1, STIM1, STK10, STXBP1, SUMO1, SYT6, TACSTD2, TDGF1, TEK, TFRC, TGFBR1, TGFBR2, THY1, Tie1, TIMD4, TLR4, TMEM156, TMIGD1, TMIGD2, TMUB2, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10D, TNFRSF11A, TNFRSF13B, TNFRSF14, TNFRSF17, TNFRSF18, TNFRSF19, TNFRSF1A, TNFRSF21, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFSF10, TNFSF13B, TPO, TREM1, TREML1, TREML2, TSPAN1, TSPAN7, TYRP1, UCHL1, ULBP2, UNC5A, USP30, VAPB, VASN, VCAM1, VLDLR, VNN2, VSIG2, VSIG4, VSTM1, VTCN1, VWC2, XPNPEP2。

[0055] 其中上述第一抗体组的抗体数目不少于100种,例如约150种、200种、250种、300种、350种、400种、450种、500种或503种。

[0056] 抗体芯片技术是一种应用于蛋白质检测的常用方法。可以同时检测上百个蛋白指标,具有检测速度快、样本用量少、灵敏度高、稳定性好、集成度高等优点,是用来开发多指标同时检测的最优技术选择。最新的研究发现,利用抗体芯片技术,通过抗体特异性地识别EVs膜蛋白,可以进行EVs的捕获[Malene J, Rikke B, Shona P, et al. Extracellular Vesicle (EV) Array: microarray capturing of exosomes and other extracellular vesicles for multiplexed phenotyping[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2013, 2(2):1-9.].该研究预示着,可以利用抗体芯片,无需提取EVs蛋白,只需少量的样本,就可以同时实现EVs的分离和EVs膜蛋白的检测。但已报道捕获EVs的抗体芯片,其包含的抗体数量较少,针对EVs膜蛋白的特异性较低,严重制约了利用抗体芯片开展EVs膜蛋白组成的高通量检测。

[0057] 因此,通过开发一种针对EVs膜蛋白的高通量和高特异性的抗体芯片,将可以同时实现EVs的高效分离和EVs膜蛋白组成的高通量检测。从而极大地推进EVs膜蛋白组成的研究进展,推动EVs作为疾病诊断标志物以及疾病治疗的应用。

[0058] 在一些实施方式中,所述第一抗体组选自表1中所描述的抗体。

[0059] 在一些实施方式中,所述第一抗体组中的抗体以每种抗体180~220 μ g/ml的浓度,或190 μ g/ml、200 μ g/ml、210 μ g/ml的浓度包被在所述固相载体上。

[0060] 在一些实施方式中,所述固相载体还包被有阳性对照抗体;

[0061] 所述阳性对照为标记有所述用于显示信号强度的标记物,且与所述第二抗体组为同型对照抗体。

[0062] 在一些实施方式中,所述阳性对照抗体按照浓度梯度设置于多个孔内。

[0063] 在一些实施方式中,所述阳性对照抗体设置有3、4、5、6、7、8、9或10个孔。

[0064] 在一些实施方式中,所述固相载体还设置有阴性对照孔;

[0065] 所述阴性对照孔中仅添加孵育缓冲液。

[0066] 在一些实施方式中,所述第二抗体组为CD9、CD63和CD81。

[0067] 在一些实施方式中,所述第二抗体组还包括CD82。

[0068] 在一些实施方式中,所述标记物选自荧光物质、量子点、地高辛标记探针、生物素、放射性同位素、放射性造影剂、顺磁离子荧光微球、电子致密物质、化学发光标记物、超声造影剂、光敏剂、胶体金或酶中的任一种。

[0069] 在一些实施方式中,所述荧光物质包括Alexa 350、Alexa 405、Alexa 430、Alexa 488、Alexa 555、Alexa 647、AMCA、氨基吡啶、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、5-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素、5-羧基-2',4',5',7'-四氯荧光素、5-羧基荧光素、5-羧基罗丹明、6-羧基罗丹明、6-羧基四甲基罗丹明、Cascade Blue、Cy2、Cy3、Cy5、Cy7、6-FAM、丹磺酰氯、荧光素、HEX、6-JOE、NBD (7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑)、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、邻苯二甲酸、对苯二甲酸、间苯二甲酸、甲酚固紫、甲酚蓝紫、亮甲酚蓝、对氨基苯甲酸、赤藓红、酞菁、偶氮甲碱、花青、黄嘌呤、琥珀酰荧光素、稀土金属穴状化合物、三双吡啶基二胺铈、铈穴状化合物或螯合物、二胺、双花青苷、La Jolla蓝染料、别藻蓝蛋白、allocoyanin B、藻蓝蛋白C、藻蓝蛋白R、硫胺、藻红青蛋白、藻红蛋白R、REG、罗丹明绿、罗丹明异硫氰酸酯、罗丹明红、ROX、TAMRA、TET、TRIT (四甲基罗丹明异硫醇)、四甲基罗丹明和德克萨斯红中的任一种。

[0070] 在一些实施方式中,所述放射性同位素包括¹¹⁰In、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹⁸F、⁵²Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁸⁹Zr、^{94m}Tc、⁹⁴Tc、^{99m}Tc、¹²⁰I、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁵⁴⁻¹⁵⁸Gd、³²P、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁵¹Mn、⁵²Mn、⁵⁵Co、⁷²As、⁷⁵Br、⁷⁶Br、⁸²mRb和⁸³Sr中的任一种。

[0071] 在一些实施方式中,所述荧光微球为:聚苯乙烯荧光微球,内部包裹有稀土荧光离子铈。

[0072] 在一些实施方式中,所述标记物选自辣根过氧化酶、碱性磷酸酶和葡萄糖氧化酶中的任一种。

[0073] 在一些实施方式中,所述固相载体为玻片或膜式基片。

[0074] 在一些实施方式中,所述固相载体被高分子所修饰,或表面涂有高分子膜。

[0075] 在一些实施方式中,所述高分子选自氨基、醛基、环氧树脂、巯基、聚糖。

[0076] 在一些实施方式中,所述高分子膜选自聚乙烯醇薄膜、琼脂糖薄膜或聚乙烯醇-琼脂糖复合薄。

[0077] 在一些实施方式中,所述固相载体还具有聚二甲基硅氧烷、聚乙烯或聚乙二醇衍生物涂层。

[0078] 在一些实施方式中,所述方法还包括:分析EVs的粒径特征和/或浓度特征。

[0079] 在一些实施方式中,所述分析以纳米颗粒跟踪分析技术进行;例如Malvern纳米颗粒跟踪分析仪NanoSight LM14。

[0080] 在一些实施方式中,所述方法还包括,将EVs从所述固相载体洗脱下来,所用的洗脱液为80mM~120mM,pH 2.2~2.6的glycine-HCl溶液;

[0081] 在一些实施方式中,所用的洗脱液为100mM,pH 2.4的glycine-HCl溶液。

[0082] 本发明还请求保护上述所提及的第一抗体组。

[0083] 本发明还请求保护上述所提及的固相载体。

[0084] 本发明还请求保护试剂盒,其含有上述所提及的固相载体以及第二抗体组。

[0085] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会

理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0086] 实施例1抗体芯片的制备

[0087] 正对照生物素标记的IgG抗体浓度为0.04 μ g/ml,0.2 μ g/ml,1 μ g/ml,5 μ g/ml,负对照为PBS溶液。针对EVs膜蛋白的特异性抗体浓度为200 μ g/ml,溶解在含有5%甘油的PBS中。特异性抗体的生产产商为Sino Biological Inc,特异性抗体的名称、货号的详细信息如表1所示。

[0088] 表1特异性抗体名称、货号

[0089]

抗体名称	货号	抗体名称	货号	抗体名称	货号
ACP1	10957-T62	EDA2R	11845-MM05	MUC1	12123-MM05
ACVR1B	10583-T48	EDAR	11577-RP01	NAALADL1	11146-R029

[0090]

ACVR2A	10257-T48	EFNA1	10882-RP02	NAPA	14800-T54
ACVR2B	10229-T20	EFNA3	10188-MM08	NCAM2	16067-RP01
ACVRL1	10066-RP02	EFNA5	10192-RP01	NCKIPSD	13642-RP01
ADA	14737-T52	EFNB1	10894-RP01	NCR3	10480-R012
ADAM15	10517-R007	EFNB2	10881-RP01	NCR3LG1	16140-RP01
ADGRD1	15992-RP01	EGF	10605-R008	NCSTN	11183-RP02
AGER	11629-T56	EGFR	10001-R021	NDRG1	14119-T62
AIF1	14227-T52	EIF5A2	14927-R002	NECTIN3	10852-RP02
AK2	13146-RP02	ENG	10149-T26	NLGN1	11617-RP01
AKT1	10763-T54	ENO1	11554-RP02	NLGN3	11160-RP01
ALOX5AP	11623-T16	ENPP5	11519-R014	NLGN4X	15681-RP01
ALPI	13225-RP02	ENPP7	10885-RP02	NPC1	16499-T24
ALPL	100356-R071	ENTPD3	10909-R101	NPTN	15881-T24
AMIGO2	13735-T16	EpCAM	10694-R028	NRAS	12073-MM06
ANPEP	10051-RP02	EPHA1	15789-T16	NRG1	13499-T48
APLP1	13716-T16	EphA2	13926-T16	NRG3	16071-MM06
APP	10703-RP01	EphA4	11314-T24	NRG4	12183-R001
ARG1	11558-R034	EphB2	10762-RP01	NRP1	10011-R042
ARL2BP	14357-RP01	EphB3	13925-RP02	NRP2	10695-MM01
ART3	13542-T24	EphB4	10235-MM04	NRXN3	11843-RP01
ASGR1	10773-RP02	EphB6	10197-T24	NT5E	10904-T52
ASGR2	13908-R002	EPOR	10707-MM11	NTNG1	12313-T16
ATF2	11599-T56	ERBB3	10201-RP02	NTRK1	11073-MM04
ATL3	15483-T52	ERN1	11905-MM01	NTRK2	10047-MM12
ATP1B4	13027-R108	ESAM	10187-RP02	NTRK3	10048-MM06
ATP5D	14630-T60	EZR	12858-T60	OLFM4	11639-MM12
AXL	10279-MM05	F11R	10198-RP04	OLR1	10585-T26
BACE1	10064-MM01	F3	13133-MM05	OMG	10269-RP02
BAMBI	10890-RP02	FAM171B	13757-T16	OPTN	14478-T52
BCAM	10238-RP02	FCER1A	13193-T50	OSMR	11226-MM01
BCL2	10195-MM01T	FCER2	10261-MM05	OSTM1	10913-MM10
BCL2L1	10455-R016	FCGR2A	10374-MM02	P4HB	10827-R016

[0091]

BCL2L2	10059-R003	FCGR2B	10259-R112	PARK7	12484-T56
BIN2	15226-T48	FCGR3A	10389-T24	PARM1	15420-RP01
BLNK	12706-RP02	FCGR3B	11046-MM01	PARVA	13919-T52
BMPR1A	10446-T24	FCRL1	11536-RP01	PDCD1	10377-MF07
BMPR1B	10460-T48	FCRL2	16041-T48	PDCD1LG2	10292-R018
BMPR2	10551-RP01	FES	12214-T26	PDE2A	13031-RP01
BNIP3L	12488-RP01	FGF1	10013-MM01	PDGFC	10273-R004
BPI	13907-MM04	FGF2	10014-MM11	PDGFRA	10556-MM02
BSG	10186-R125	FGFR1	10616-T16	PDGFRB	10514-MM11
BST1	10060-MM05	FLRT1	11389-MM07	PECAM1	10148-T62
BST2	13370-T60	FLRT2	11296-MM07	PGD	10393-T62
BTN3A3	13432-RP01	FLRT3	11166-RP02	PIGR	10131-MM05
BVES	12508-RP01	FLT3	10445-RP02	PLAUR	10925-MM04
CIQBP	11874-MM04	FLT3LG	10315-MM08	PPM1A	12984-T50

[0092]

CA12	10617-MM08	FLT4	10806-RP04	PRKAR1A	14416-T52
CA14	10458-T60	FOLH1	15877-RP01	PRLR	10278-R204
CA2	10478-RP02	FOLR2	11219-R046	PROCR	13320-T16
CA4	10472-R039	FUT10	11327-R003	PTGDS	13346-MM07
CA9	10107-R003	GALNT2	13764-T62	PTH1R	12232-RP02
CADM1	11168-RP01	GALNT7	15197-T20	PTP4A2	13097-R015
CADM3	11214-R003	GAPDH	10094-T52	PTPMT1	12902-T48
CAMKV	12243-T26	GBP2	13930-RP01	PTPN1	10304-RP02
CD14	10073-RP02	GFER	15278-T24	PTPRC	10086-RP01
CD164	12260-MM05	GFRA2	10331-RP01	PTPRJ	13165-MM10
CD177	14501-MM08	GFRA3	10213-R118	RAB11B	15636-T16
CD19	11880-R303	GGT5	16136-T56	RAB27B	16007-RP01
CD2	10982-RP02	GLT8D2	16019-T48	RAB31	15518-T16
CD200	10886-MM17	GNG13	13173-T24	RAB6A	16015-T54
CD200R1L	11620-MM09	GNGT1	13658-RP01	RAC1	10535-T16
CD22	11958-R340	GOLM1	13066-RP04	RAET1E	16073-RP01
CD226	10565-R102	GOPC	14911-T60	RAET1L	15759-RP01
CD244	10042-R025	GPA33	11277-R071	RELT	10530-R111
CD247	13142-T52	GPIHBP1	15388-RP01	REN	10969-R009
CD27	10039-T24	GPNMB	11305-R105	RET	11997-RP01
CD274	10084-R015	GPR37	13496-RP01	RGMA	12086-T16
CD276	11188-MM06	GRK5	10839-RP02	RHOA	12441-MM03
CD28	11524-R007	GUCA1A	14565-RP01	RNF43	16108-MM06
CD300A	12449-RP01	GYPA	16018-RP01	ROM1	14179-RP01
CD300C	11832-MM01	GYPC	15627-T60	RTN4	13030-RP01
CD300LG	13365-R102	HAVCR1	11051-MM04	RUVBL1	14074-T60
CD33	12238-R001	HAVCR2	10390-MM04	S100A12	11143-RP02
CD34	10103-R009	HJV	10410-MM08	S100A6	10939-T60
CD36	10752-RP02	HRAS	12059-T52	S100A8	11138-T58
CD38	10818-R003	HSPA1A	11660-R001	S100A9	11145-R018
CD3D	10981-MM08	HTRA2	10619-T60	S100P	12635-RP02
CD3E	10977-T20	ICAM1	10346-RP02	SCGN	12411-RP02

[0093]

CD4	10400-R104	ICAM2	10332-RP02	SCN2B	13859-T24
CD40	10774-RP02	ICAM3	10333-RP02	SDC1	11429-R001
CD40LG	10239-MM04	ICAM5	16050-T56	SDC3	12158-T48
CD44	12211-MM01	ICOSLG	11559-MM05	SECTM1	12269-RP02
CD46	12239-RP02	IFNAR1	13222-T16	SELE	10335-R040
CD47	12283-MM01	IFNGR1	10338-R010	SELL	11838-MM01
CD48	10797-RP04	IGF1R	10164-MM04	SELP	13025-MM17
CD5	11027-RP02	IGSF11	13094-T16	SELPLG	13863-T60
CD55	10101-RP02	IGSF3	11290-T24	SEMA4A	11756-RP02
CD58	12409-T50	IGSF8	13435-T16	SEMA4D	11825-RP02
CD59	12474-RP02	IL10RB	10945-T48	SEMA6A	11189-T50
CD63	11271-MM10	IL11RA	10252-T52	SerpinA5	10309-MM01
CD68	11192-T56	IL12RB1	11674-MM05	SFRP1	10680-T24
CD69	11150-R074	IL13Ra1	10943-MM03	SIGIRR	12165-R016

[0094]

CD7	11028-R015	IL13Ra2	10350-RP01	SIRPA	11612-MM03
CD74	11091-RP02	IL17RA	10895-MM06	SIRPG	11828-RP02
CD80	10698-MM01	IL17RB	13091-MM09	SIRT1	11748-MM04
CD81	14244-RP01	IL17RC	11747-R209	SLAMF1	10837-R008
CD82	12275-RP02	IL17RD	10507-R001	SLAMF6	11945-MM10
CD83	11763-RP02	IL18R1	11102-MM08	SLAMF7	11691-MM02
CD84	10100-R006	IL18RAP	10176-T16	SLC27A4	13861-RP01
CD86	10699-MM02	IL1R1	10126-MM10	SLC3A2	12206-R065
CD8A	10980-MM01	IL1RAPL1	10177-MM06	SLITRK1	10340-R001
CD93	12589-MM02	IL1RAPL2	10156-MM02	SLITRK4	13147-T16
CD96	11202-RP01	IL1RL1	10105-RP01	SLITRK6	13922-T16
CDC42	10062-T52	IL20RA	10397-R024	SNAP25	11585-RP02
CDC42BPB	11540-RP01	IL21R	11483-T24	SNCA	12093-R017
CDH1	10204-T58	IL2RA	10165-MM14	SPARC	10929-RP02
CDH12	10317-MM01	IL2RG	10555-MM10	SPINT2	10324-RP01
CDH16	10915-T24	IL31RA	15878-T24	ST6GAL1	11590-RP02
CDH17	11360-RP02	IL3Ra	10518-R017	STIM1	11434-RP02
CDH2	11039-R020	IL4R	10402-MM01	STK10	11724-RP01
CDH4	10230-RP01	IL6R	10398-MM01	STXBP1	11751-T60
CDH5	10433-R048	IL6ST	10974-MM06	SUMO1	13095-RP02
CDH6	10150-MM08	INSR	11081-RP02	SYT6	15218-T16
CDH8	10144-R032	ITCH	11131-RP01	TACSTD2	10428-RP02
CDK4	10732-T62	IZUMO1	13520-RP01	TDGF1	10908-MM05
CDON	11965-R076	JAML	10120-MM05	TEK	10700-R116
CEACAM1	10822-MM02	KCNIP3	14683-T52	TFRC	11020-RP02
CEACAM3	11933-T24	KIR2DL1	13145-MM07	TGFBR1	10459-T56
CEACAM5	11077-MM08	KIR2DL3	12828-R014	TGFBR2	10358-T16
CEACAM6	10823-R408	KIR2DL4	13052-MM11	THY1	16897-MM09
CEACAM8	11729-MM04	KIRREL2	15674-RP01	Tie1	10509-MM03
CFL1	14544-T60	KLK7	10416-RP02	TIMD4	12161-R101
CHL1	10143-MM01	KLRC1	13905-T48	TLR4	10146-T16
CHRN3	15380-T16	KLRK1	10575-MM02	TMEM156	15765-T16

[0095]

CIB2	12596-R001	KREMEN1	16100-T16	TMIGD1	14530-RP01
CKMT1A	13924-T52	LICAM	10140-MM01	TMIGD2	13820-T16
CLEC1B	10976-R004	LAMP1	11215-R107	TMUB2	13660-MM09
CLEC4A	11476-MM08	LAMP2	13555-MM02	TNFRSF10A	10408-MM01
CLEC4D	11485-R001	LAMP3	10527-T60	TNFRSF10B	10465-R102
CLIC4	12271-RP02	LAYN	10208-MM02	TNFRSF10D	10413-T60
CLMP	10794-MM05	Lck	10043-T56	TNFRSF11A	16078-R107
CLSTN1	16035-T24	LDLR	10231-MM02	TNFRSF13B	11937-R006
CLTRN	13301-T16	LEPR	10322-MM05	TNFRSF14	10334-MM13
CNTN1	10383-MM01	LIFR	10628-MM07	TNFRSF17	10620-RP01
CNTN2	10457-MM01	LILRB1	16014-RP01	TNFRSF18	13643-MM11
CNTN3	10174-MM01	LILRB2	14132-MM11	TNFRSF19	13387-MM02
CNTN5	10513-MM02	LILRB3	11978-MM01	TNFRSF1A	10872-MM04
COQ7	12195-MM01	LMAN2	12455-MM02	TNFRSF21	10175-T48

[0096]

COX5B	15660-T60	LOXL2	11664-MM15	TNFRSF4	10481-MM03
CPE	10069-R001	LRP10	13228-T16	TNFRSF8	10777-RP02
CPLX3	14518-T24	LRP11	13952-T24	TNFRSF9	10041-RP01
CPM	11228-R105	LRRC3B	15120-RP01	TNFSF10	10409-RP02
CR2	10811-RP02	LRRN3	11610-RP01	TNFSF13B	10056-RP02
CREB3L1	12712-RP01	LTA	10270-MM02	TPO	13194-T58
CRELD1	13411-MM04	LTC4S	11622-RP01	TREM1	10511-T24
CRTAM	11975-MM06	LXN	10211-R101	TREML1	11934-R027
CSF1	11792-MM16	LY75	16490-MM16	TREML2	11655-R001
CSF1R	10161-RP02	LYPD3	11836-R213	TSPAN1	13073-R010
CSF2RB	10516-R001	MAP1LC3B	14555-T52	TSPAN7	14031-MM01
CTLA4	11159-RP02	MAPK9	10745-R011	TYRP1	13224-RP01
CTNNB1	11279-R021	MAPT	10058-RP01	UCHL1	11663-R104
CX3CL1	10636-R409	MCAM	10115-R044	ULBP2	12143-RP02
DCBLD2	13615-T16	MEP1A	10133-R009	UNC5A	13424-T16
DCXR	14562-T60	MEP1B	10708-MM09	USP30	14548-RP01
DDOST	12463-MM02	MERTK	10298-MM09	VAPB	10754-RP02
DDR2	10209-T16	MET	10692-R243	VASN	13854-MM04
DHRS9	15253-T52	MICA	12302-RP02	VCAM1	10113-T56
DLL1	11635-RP01	MICB	10759-MM12	VLDLR	11075-MM04
DLL4	10171-MM06	MME	10805-T52	VNN2	11728-MM04
DMBT1	11678-RP02	MMP2	10082-MM05	VSIG2	11543-RP02
DPEP1	13543-RP01	MOB4	12358-T52	VSIG4	12163-T24
DPEP2	13806-RP01	MOG	10364-RP02	VSTM1	13171-MM01
DPP10	11760-R004	MS4A1	11007-T56	VTCN1	10738-T24
DSC2	10809-RP02	MSN	13659-T16	VWC2	12071-RP02
EBAG9	14012-T60	MSR1	10427-T48	XPNPEP2	11903-RP02
ECE1	10887-T16	MST1R	11608-T24		

[0097] 固相载体采用德国SCHOTT公司NEXTERION环氧基包被玻片,使用自动点样仪按照一定排列方式将上述抗体点制到包被玻片上,每个抗体点设置两个重复。

[0098] 实施例2样本前处理

[0099] 本实施例为针对CCC-HEL-1细胞培养上清进行EVs的初步分离:收集CCC-HEL-1细胞培养上清,300g离心10min,收集上清,去除细胞;再3000g离心10min,收集上清,去除细胞碎片;再10000g离心30min,收集上清,去除亚细胞成分;再用100KD超滤离心管进行浓缩,PBS洗涤3次,最终体积浓缩约100倍。

[0100] 然后,利用Malvern纳米颗粒跟踪分析仪NanoSight LM14进行初步分离获得的EVs的粒径以及浓度分析。检测结果如图1所示,经过前处理的样品中EVs浓度为 2.3×10^8 个/ μ l,粒径主要分布在150nm左右。

[0101] 实施例3抗体芯片分离EVs并进行EVs膜蛋白组成的分析

[0102] 将经过初步处理的样本加入到抗体芯片,分离EVs。具体方法如下:

[0103] (1) 加样:加入抗体芯片的经过前处理的EVs浓度为 10^5 - 10^8 个/ μ l,加入的体积为100 μ l。水平摇床上较低转速(60rpm/min)室温孵育2h。然后转移至4 $^{\circ}$ C继续孵育18h。

[0104] (2) 洗涤:从样品池里吸出样品,加入100 μ l含有0.2%Tween20的PBS溶液洗涤3次,每次5min。

[0105] (3) 检测:加入检测抗体的混合液(针对EVs膜蛋白标志物CD9,CD63,CD81的生物素标记抗体),水平摇床上较低转速(60rpm/min)室温孵育2h。从样品池中吸出生物素标记的抗体混合液,重复步骤(2)的洗涤过程。加入100 μ l的Cy3-Streptavidin,用锡箔纸包住玻片避光室温孵育2h,再重复步骤(2)的洗涤过程。检测抗体的名称、来源、浓度的详细信息如表2所示。

[0106] 表2检测抗体名称、来源和浓度

[0107]

检测抗体名称	货号	浓度	产商
anti-human CD9/biotin	156-030	1ug/ml	Ancell
anti-human CD63/biotin	215-030	1ug/ml	Ancell
anti-human CD81/biotin	302-030	1ug/ml	Ancell

[0108] (4) 扫描:利用激光扫描仪例如Axon GenePix扫描信号,采用激发频率532nm的通道。具体扫描结果如图2所示,CD226,CX3CL1的信号值较强,因此可以作为CCC-HEL-1细胞的EVs膜蛋白标志物。

[0109] 实施例4抗体芯片捕获的EVs的特征鉴定

[0110] 将200 μ l洗脱液(100mM of glycine-HCl,pH 2.4)加入到捕获了EVs的抗体芯片样品池里,室温孵育30min。吸取上清,利用Malvern纳米颗粒跟踪分析仪NanoSight LM14进行被捕获的EVs粒径以及浓度分析。具体检测结果如图3所示,芯片捕获的EVs浓度达到 3.75×10^5 个/ μ l,粒径分布为100~300nm。

[0111] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,但本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

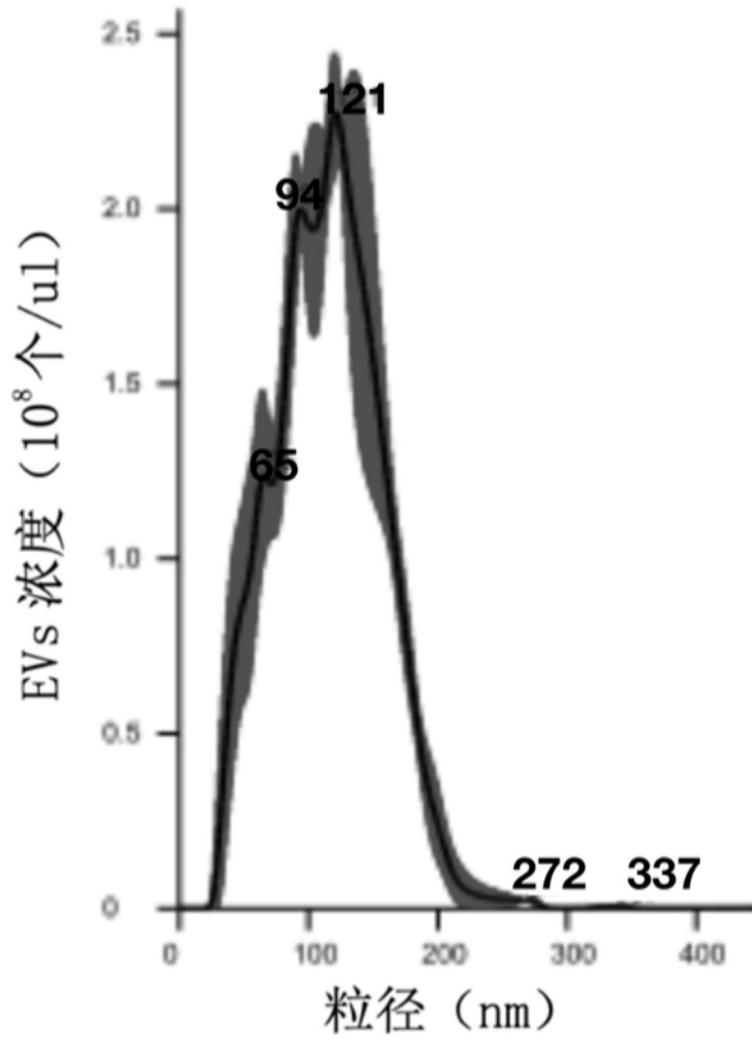


图1



图2

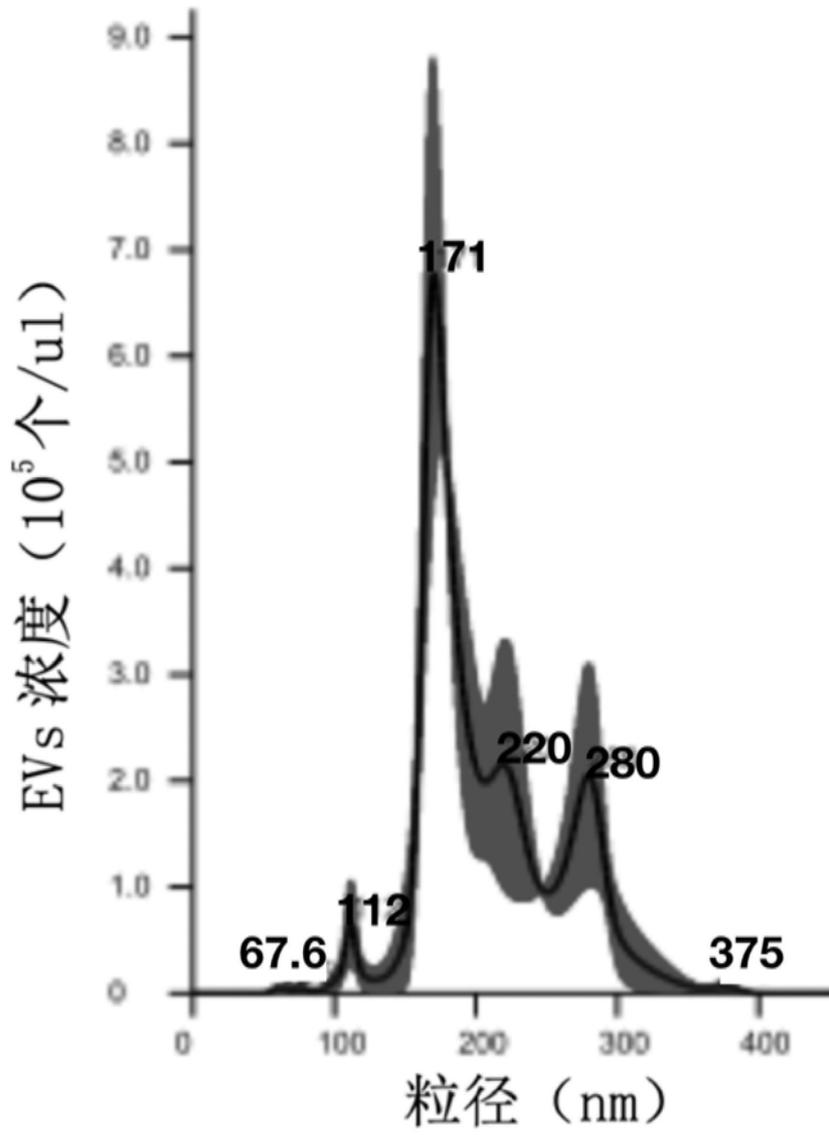


图3

专利名称(译)	检测细胞外囊泡的膜蛋白的方法		
公开(公告)号	CN111323598A	公开(公告)日	2020-06-23
申请号	CN201910376587.9	申请日	2019-05-07
[标]发明人	樊萌		
发明人	樊萌		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/58 G01N33/532		
代理人(译)	王焕		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物检测领域，具体而言，涉及一种检测细胞外囊泡的膜蛋白的方法。该方法包括：a)将含有细胞外囊泡(EVs)的组合物与固相载体共孵育；所述固相载体包被有抗EVs的膜蛋白的第一抗体组；b)洗去非特异性结合的EVs及其它杂质；c)加入用于检测的第二抗体组进行信号检测；所述第二抗体组为EVs的生物标志物的抗体，且偶联有用于显示信号强度的标记物。该方法操作简便，可根据情况灵活调整检测通量，灵敏度高。

