



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105974122 B

(45)授权公告日 2018.09.28

(21)申请号 201610296295.0

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2016.05.04

G01N 27/26(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105974122 A

(56)对比文件

CN 1906307 A,2007.01.31,

CN 1588071 A,2005.03.02,全文.

(43)申请公布日 2016.09.28

V. Ruiz-Valdepeñas Montiel et

(73)专利权人 华东医药(杭州)基因科技有限公司

al..Sensitive and selective
magnetoimmunosensing platform for
determination of the food allergen Ara h
1.《Analytica Chimica Acta》.2015,第880卷

地址 310000 浙江省杭州市江干区水湘路
341号(金骏大厦)1114室

Sonia A. Melo et al..Glypican-1

(72)发明人 相双红 凌志强 宋小慧 叶慧

identifies cancer exosomes and detects
early pancreatic cancer.《NATURE》.2015,第
523卷

(74)专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224

代理人 沈自军

审查员 赵晓明

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

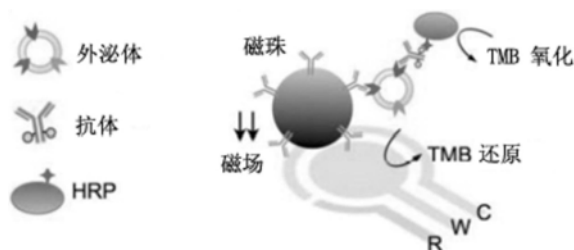
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种检测外泌体GPC1蛋白的方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测外泌体GPC1蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:(1)取待测样品;(2)向待测样品中加入修饰有外泌体特异性抗体的免疫磁珠;(3)依次加入生物素标记的抗GPC1抗体、链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶和辣根过氧化物酶的底物;(4)使用磁力-电化学传感器装置进行检测。本发明方法结合了免疫磁珠技术与电化学传感器检测技术的优点,灵敏度高、所需样本量小,同时检测所用设备成本低、小型化且可高通量、特异性地检测表达有GPC1蛋白的特定外泌体,对癌症早期诊断和治疗检测具有重要意义。



1. 一种非医学诊断为目的的检测外泌体GPC1蛋白的方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - (1) 取待测样品;
 - (2) 向待测样品中加入修饰有外泌体特异性抗体的免疫磁珠;
 - (3) 依次加入生物素标记的抗GPC1抗体、链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶和辣根过氧化物酶的底物;
 - (4) 使用磁力-电化学传感器装置进行检测,所述外泌体特异性抗体为抗CD9抗体、抗CD63抗体和抗Flotillin-1抗体三种混合,所述修饰有外泌体特异性抗体的免疫磁珠的制备方法为:
 - (1) 使用磷酸钠溶液对带有环氧基团的磁珠进行活化;
 - (2) 分离磁珠并重新分散于磷酸钠溶液中;
 - (3) 加入外泌体特异性抗体,混匀;
 - (4) 加入硫酸铵溶液进行反应;
 - (5) 反应完成后的磁珠用PBS进行洗涤,即制得所述修饰有外泌体特异性抗体的免疫磁珠。
2. 如权利要求1所述检测外泌体GPC1蛋白的方法,其特征在于,抗CD9抗体、抗CD63抗体和抗Flotillin-1抗体的质量比为1:1:1。
3. 如权利要求1所述检测外泌体GPC1蛋白的方法,其特征在于,所述带有环氧基团的磁珠直径为2.2~3.2 μm 。
4. 如权利要求1所述检测外泌体GPC1蛋白的方法,其特征在于,所述带有环氧基团的磁珠与外泌体特异性抗体的质量比为40~60:1。
5. 如权利要求1所述检测外泌体GPC1蛋白的方法,其特征在于,所述生物素标记的抗GPC1抗体由磺基-NHS-生物素与抗GPC1抗体进行交联制得。
6. 如权利要求1所述检测外泌体GPC1蛋白的方法,其特征在于,所述辣根过氧化物酶的底物为TMB。

一种检测外泌体GPC1蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术检测领域,特别是涉及一种检测外泌体GPC1蛋白的方法。

背景技术

[0002] 外泌体是细胞经过“内吞-融合-外排”等一系列调控过程而形成的细胞外纳米级小囊泡,直径约为50-150nm。外泌体可以携带蛋白,运送RNA,在细胞间物质和信息转导中起重要作用。外泌体可能通过调控免疫功能,促进肿瘤血管新生和肿瘤转移,以及直接作用于肿瘤细胞等途径,影响肿瘤的进展。外泌体可应用于肿瘤的诊断。肿瘤外泌体是体内肿瘤细胞所分泌的含有特定标记物的外泌体,检测肿瘤外泌体可对整个肿瘤检测提供准确信息。因外泌体在体液(如血清,腹水,尿液,脑脊液)中含量丰富,肿瘤外泌体检测属于微创分析,且不受样本含量及瘤内异质性的限制。

[0003] 1986年,有学者在体外培养的绵羊红细胞上清液中发现了一种有膜结构的小囊泡,被称之为外泌体。至1996年,有学者发现EB病毒转化的人B细胞内一些有膜结构的小囊泡表面可表达主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex,MHC) II类分子,能激活T细胞,并与红细胞内外泌体的形成过程和排出途径相似。自此之后,人们对外泌体的研究集中于它的免疫刺激作用。研究发现,抗原提呈细胞(antigen-presenting cell,APC)分泌的外泌体可以刺激T细胞的体外增殖和诱导体内的抗肿瘤免疫反应。从肿瘤细胞中分泌出的包含肿瘤抗原的外泌体则可以通过APC交叉呈递给细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL),使其产生肿瘤杀伤作用。因此,外泌体作为一种潜力巨大的肿瘤疫苗,得到了广泛的研究。然而,有学者发现肿瘤细胞来源的外泌体对肿瘤生长具有促进作用。一项研究报道,给予预先种植卵巢癌细胞的小鼠腹腔注射从卵巢癌患者腹腔积液中分离出的外泌体,可以明显促进小鼠腹腔内肿瘤的生长。从小鼠皮下肿瘤实体中分离出外泌体,证实其具有促进肿瘤生长的作用。

[0004] Glypican-1(简称GPC1,中文名磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1),是肿瘤外泌体的特定标记物,研究发现GPC1在胰腺癌和乳腺癌细胞外泌体中大量表达,且外泌体GPC1的含量与肿瘤大小成正比。外泌体GPC1蛋白检测可用于临床癌症诊断和治疗监测,具有重要意义。目前外泌体GPC1蛋白检测方法有传统的分子测定法(例如Western印迹,ELISA)和流式细胞仪法,传统的分子测定法需要大量样品,无法在临床实施,流式细胞仪价格昂贵,不适于临床推广。

[0005] 因此开发出高灵敏度、高选择性、价钱低廉、制备简单测定GPC1的方法引起了人们的研究兴趣。

[0006] 免疫磁珠(Immunomagnetic beads,IMB)是免疫学和磁载体技术相结合而发展起来的一类新型材料。IMB是包被有单克隆抗体的磁性微球,可与含有相应抗原的靶物质特异性地结合形成新的复合物,通过外加磁场的作用,使磁球和上清快速分离,可以在短时间内得到浓缩、纯净的待测样品,缩短检测时间,提高检测效益和灵敏度。目前,MB-ELISA检测方法是免疫磁珠在免疫检测领域最主要的应用,其采用免疫磁珠配合常规ELISA方法主要用

于免疫检测、细胞和微生物的分离和蛋白质、DNA、RNA以及mRNA等生物大分子纯化检测,其基本步骤为:一、用抗原和磁珠进行偶联,制备免疫磁珠。二、将检测样品和第一种抗体(简称一抗)按一定比例混合,然后在其中加入适量体积的第一步制备出的免疫磁珠,使免疫磁珠上的抗原和样品中的抗原竞争结合一抗,然后通过磁性分离,除去上清。三、加入一定体积的过氧化物酶标记过的二抗,然后放在37℃条件下温育1小时,再通过磁性分离,除去上清。四、加底物显色15分钟,把显色液移入96孔ELISA反应板中,放入酶标仪中读数。

发明内容

[0007] 针对现有技术的不足,本发明提供了一种将免疫磁珠技术与电化学传感器检测技术相结合来检测外泌体GPC1蛋白的方法。

[0008] 一种检测外泌体GPC1蛋白的方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 取待测样品;

[0010] (2) 向待测样品中加入修饰有外泌体特异性抗体的免疫磁珠;

[0011] (3) 依次加入生物素标记的抗GPC1抗体、链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶和辣根过氧化物酶的底物;

[0012] (4) 使用磁力-电化学传感器装置进行检测。

[0013] 所述样品为血清、腹水、尿液、脑脊液。

[0014] 所述磁力-电化学传感器装置用于检测反应中产生的微量电流。通过计时安培分析法接收并分析电化学传感器的电信号,电流通常控制在40~45s范围内。工作电极是还原电位(-100V vs Ag/AgCl参比电极),电流水平在1min之内达到平台,值取40-50s产生的平均电流(I)。以对照抗体(IgG)作为阴性对照,其作用在于补偿由于非特异性结合的外泌体产生的背景信号,Im差值越大,说明信号越强,检测到的GPC1蛋白越多。

[0015] 优选的,所述外泌体特异性抗体为抗CD9抗体、抗CD63抗体、抗CD81抗体和抗Flotillin-1抗体中的一种或一种以上的组合。

[0016] 更优选的,所述外泌体特异性抗体为抗CD9抗体、抗CD63抗体和抗Flotillin-1抗体三种混合。

[0017] 优选的,抗CD9抗体、抗CD63抗体和抗Flotillin-1抗体的质量比为1:1:1。

[0018] 优选的,所述修饰有外泌体特异性抗体的免疫磁珠的制备方法为:

[0019] (1) 使用磷酸钠溶液对带有环氧基团的磁珠进行活化;

[0020] (2) 分离磁珠并重新分散于磷酸钠溶液中;

[0021] (3) 加入外泌体特异性抗体,混匀;

[0022] (4) 加入硫酸铵溶液进行反应;

[0023] (5) 反应完成后的磁珠用PBS进行洗涤,即制得所述修饰有外泌体特异性抗体的免疫磁珠。

[0024] 优选的,所述带有环氧基团的磁珠直径为2.2~3.2μm。最优选的,所述带有环氧基团的磁珠直径为2.7μm。优选的,所述带有环氧基团的磁珠为invitrogen公司生产的M-270环氧树脂磁珠。

[0025] 优选的,所述带有环氧基团的磁珠与外泌体特异性抗体的质量比为40~60:1。最优选的,所述带有环氧基团的磁珠与外泌体特异性抗体的质量比为50:1。

[0026] 优选的,所述生物素标记的抗GPC1抗体由磺基-NHS-生物素与抗GPC1抗体进行交联制得。

[0027] 优选的,所述辣根过氧化物酶的底物为TMB。TMB的中文名称为3,3',5,5'-四甲基联苯胺了,是常用的供氢体。

[0028] 本发明一种检测外泌体GPC1蛋白的方法,通过将免疫磁珠技术与电化学传感器检测技术相结合,结合了两者的优点,本发明方法灵敏度高、所需样本量小,同时检测所用设备成本低、小型化且可高通量、特异性地检测表达有GPC1蛋白的特定外泌体,对癌症早期诊断和治疗检测具有重要意义。

附图说明

[0029] 图1为本发明磁力-电化学传感器装置图,其中,图A为外观示意图,图B为电路图;

[0030] 图2为本发明检测外泌体GPC1蛋白的机理图;

[0031] 图3为本发明方法检测GPC1蛋白的电流信号图;

[0032] 图4为不同单一抗体免疫磁珠效果检测对比图;

[0033] 图5为双抗体和三抗体免疫磁珠效果检测对比图;

[0034] 图6为本发明方法与ELISA方法检测外泌体GPC1蛋白结果对比图。

具体实施方式

[0035] 本发明使用到的抗体均为抗人的抗体,各抗体信息如表1所示。

[0036] 表1

	抗体名称	生产厂家	货号
[0037]	抗 CD9 抗体	Abcam	AB92726
	抗 CD63 抗体	Ancell	215820
[0038]	抗 CD81 抗体	Abcam	AB79559
	抗 Flotillin-1 抗体	Immunoway	YM3157
	抗 GPC1 抗体	Thermo-Scientific	PIPA528055

[0039] 实施例1磁力-电化学传感器装置

[0040] (1) 装置介绍

[0041] 装置具有8个独立通道(图1A)。每个通道都有一个恒电位仪,能够测量 $\pm 7.5\mu\text{A}$ 范围的电流。输入信号是由一个低通滤波器(截止频率5Hz)调控,以抑制高频噪声。八个恒电位仪连接到一个数字-模拟转换器用于电位控制,一个模拟-数字转换器用于信号数字化,一个多路复用器用于信道选择,以及一个用于系统操作的微控制部件(图1B)。卡边缘连接器用于连接电极盒,整个磁架有八个圆柱形磁铁置于电极盒下方,这些磁体能够将磁珠富集到传感器表面该设备能从每个通道快速读出数据(每个通道耗时50ms),所有数据能通过专门设计的软件进行检测和分析。

[0042] (2) 组装磁力-电化学传感器装置

[0043] 该装置包括一个微控制器 (Atmega328, Atmel 公司), 数字-模拟转换器 (DAC8552, 德州仪器), 模拟-数字转换器 (ADC161S626, 德州仪器), 一个多路复用器 (ADG708, ADI 公司), 和八个恒电位仪。每个电位仪由两个运算放大器 (AD8606, 模拟装置) 组成: 一个放大器用于维护工作电极和参考电极之间的电位差, 而另一个可以作为跨阻放大器将电流转换为电压信号。跨阻放大器的电流测量范围为 $\pm 7.5 \mu\text{A}$ 。八通道电极由 DropSens 公司购得 (DropSens, 西班牙)。

[0044] 实施例2免疫磁珠制备

[0045] 1mL浓度为0.1M的磷酸钠溶液中加入5mg涂覆有环氧基团的磁珠 (M-270环氧树脂磁珠, 直径 $2.7 \mu\text{m}$, 购自 Invitrogen 公司), 室温下搅拌10min。外加磁场分离磁珠, 弃去溶液, 再加入100 μL 浓度为0.1M的磷酸钠溶液, 分别加入100 μg 抗CD9抗体、抗CD63抗体、抗CD81抗体或者抗Flotillin-1抗体 (当需要制备双抗体免疫磁珠时, 两种抗体各加入50 μg ; 当需要制备三抗体免疫磁珠时, 三种抗体各加入33.3 μg) 并充分混匀 (作为阴性对照的免疫磁珠加入IgG并充分混匀), 加入100 μL 浓度为3M的硫酸铵溶液, 将混合物在 4°C 下缓慢倾斜旋转温育过夜。磁珠用PBS溶液洗涤两次, 最后分散在2mL含1%牛血清白蛋白 (BSA) 的PBS溶液中。

[0046] 实施例3抗GPC1抗体的生物素标记

[0047] 取浓度为1mg/mL的抗GPC1抗体100 μL , 用PBS稀释10倍, 然后, 加入5 μL 浓度为10mM的磺基-NHS-生物素溶液, 室温下孵育2h, 反应完成后, 通过Zeba脱盐柱 (7K MWC0, 购自 Thermo Scientific) 除去多余磺基-NHS-生物素, 得到生物素标记的抗GPC1抗体80 μg 。生物素标记的抗GPC1抗体保存于 4°C 备用。

[0048] 实施例4外泌体的提取

[0049] 人胰腺癌细胞株T3M4和Panc-1分别培养于含10%胎牛血清 (FBS) 和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的青霉素-链霉素的DMEM培养基中, 细胞培养48h后用于提取外泌体。外泌体提取步骤如下:

[0050] (1) 300g离心5min去除细胞;

[0051] (2) 培养上清通过 $0.2 \mu\text{m}$ 膜滤器过滤;

[0052] (3) 取滤过液于100000g离心1h, 收集沉淀;

[0053] (4) PBS重悬沉淀, 100000g离心1h, 收集沉淀;

[0054] (5) 将外泌体沉淀重悬于PBS溶液中, 采用Nano Sight (纳米微粒追踪分析仪) 测定所提取的外泌体浓度和大小, 调整外泌体浓度为 $10^9/\text{mL}$ 。

[0055] 实施例5磁力-电化学传感器检测

[0056] 检测原理如图2所示。

[0057] (1) 取10 μL 浓度为 $10^9/\text{mL}$ 的外泌体与50 μL 免疫磁珠溶液 ($10^8/\text{mL}$) 室温孵育15min;

[0058] (2) 外加磁场分离磁珠, 弃去溶液, 磁珠用80 μL PBS (含1%BSA) 重悬;

[0059] (3) 外加磁场分离磁珠, 弃去溶液, 磁珠重悬于80 μL PBS (含1%BSA) 溶液中, 加入10 μL 生物素标记的抗GPC1抗体 (使用前将实施例3所制备的生物素标记的抗GPC1抗体稀释到4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 室温孵育15min;

[0060] (4) 外加磁场分离磁珠, 弃去溶液, 磁珠用80 μL PBS (含1%BSA) 重悬;

[0061] (5) 外加磁场分离磁珠, 弃去溶液, 磁珠重悬于50 μL PBS (含1%BSA) 溶液中, 加入5 μL 链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶 (HRP) (用PBS以1:100比例稀释), 室温孵育15min;

[0062] (6) 外加磁场分离磁珠, 弃去溶液, 磁珠用80 μL PBS (含1%BSA) 重悬;

[0063] (7) 外加磁场分离磁珠,弃去溶液,磁珠重悬于7 μ L PBS (含1%BSA) 中;

[0064] (8) 7 μ L磁珠溶液和20 μ L TMB溶液(ThermoFisher Scientific)加样于丝网印刷电极,3min后,磁力-电化学传感器装置通过计时安培分析法接收并分析电化学传感器的电信号,电流通常控制在40~45s范围内。

[0065] 采用计时电流法检测信号,监测TMB还原所产生的电流,工作电极是还原电位(-100V vs Ag/AgCl参比电极),电流水平在1min之内达到平台,值取40-50s产生的平均电流(I)。以对照抗体(IgG)作为阴性对照,其作用在于补偿由于非特异性结合的外泌体产生的背景信号(图3), I_M 差值越大,说明信号越强,检测到的GPC1蛋白越多。

[0066] 实施例6不同抗体免疫磁珠效果检测

[0067] (1) 利用实施例5所述的方法,分别对实施例2中制备的单一抗体免疫磁珠的效果进行检测,结果如图4所示,用单一抗体免疫磁珠检测外泌体GPC1蛋白,抗CD9抗体效果最好,其次是抗Flotillin-1抗体,抗CD63抗体,抗CD81抗体效果最差。

[0068] (2) 利用实施例5所述的方法,分别对以实施例2中方法制备的双抗体免疫磁珠(因CD81抗体效果最差,所以去除掉)的效果进行检测,结果如图5所示,用单一抗体免疫磁珠检测外泌体GPC1蛋白,用抗CD9抗体+抗Flotillin-1抗体效果最好,其次是抗CD9抗体+抗CD63抗体,抗CD63抗体+抗Flotillin-1抗体效果最差。

[0069] (3) 利用实施例5所述的方法,对以实施例2中方法制备的三抗体免疫磁珠(抗CD9抗体+抗Flotillin-1抗体+抗CD63抗体)的效果进行检测,结果如图5所示,用三抗体免疫磁珠检测外泌体GPC1蛋白的效果优于任何一组双抗体免疫磁珠。

[0070] 实施例7磁力-电化学传感器检测方法对外泌体GPC1蛋白的检测限

[0071] 用磁力-电化学传感器检测方法来检测血浆中的外泌体。将实施例3从T3M4和Panc-1细胞提取收集的外泌体,使用未经稀释的健康人血浆,按10倍浓度梯度进行稀释。使用如实施例4所示方法进行检测,结果如图6所示,检测外泌体的下限为 3×10^4 ,在动态范围内跨越4个数量级。

[0072] 对比例1本发明磁力-电化学传感器检测方法与ELISA法比较

[0073] (1) 外泌体GPC1蛋白的ELISA检测

[0074] 使用96孔板,实验组中包被抗CD9抗体、抗CD63抗体和抗Flotillin-1抗体(每种抗体0.17 μ g,总共5 μ g)。设置阴性对照组实验,阴性对照采用IgG,浓度为5 μ g/mL,加入100 μ L,4 $^{\circ}$ C下孵育过夜;

[0075] PBS洗涤后,加入含2%的BSA的PBS在室温下封闭1h;

[0076] PBS洗涤后,加入100 μ L外泌体溶液(实施例3制备),室温孵育1h;

[0077] PBS洗涤后,加入生物素标记的4 μ g/ml抗GPC1抗体,室温孵育1h;

[0078] PBS洗涤后,加入链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶(HRP),室温孵育1h;

[0079] PBS洗涤后,加入TMB显色液,避光显色15min,使用浓度为2M硫酸终止反应,450nm波长测定化学发光信号。

[0080] (2) 本发明磁力-电化学传感器检测方法与ELISA法比较

[0081] 使用实施例7相同的方法准备样品,然后使用ELISA法进行检测,结果如图6所示,用ELISA法测定需要超过 10^7 的外泌体才能检测到信号,比本发明检测方法的检测下限低了3个数量级。本发明检测方法比ELISA所需样品更少(10 μ L和100 μ L),耗时更短(1h和5h)。

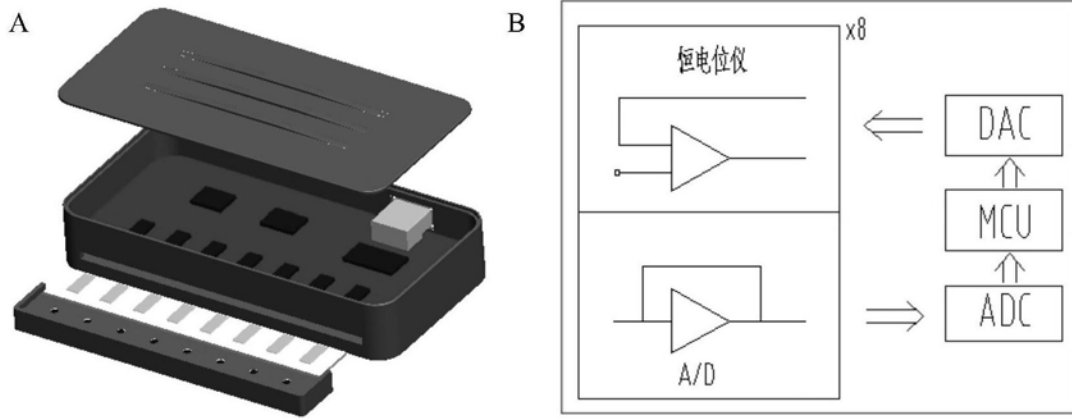


图1

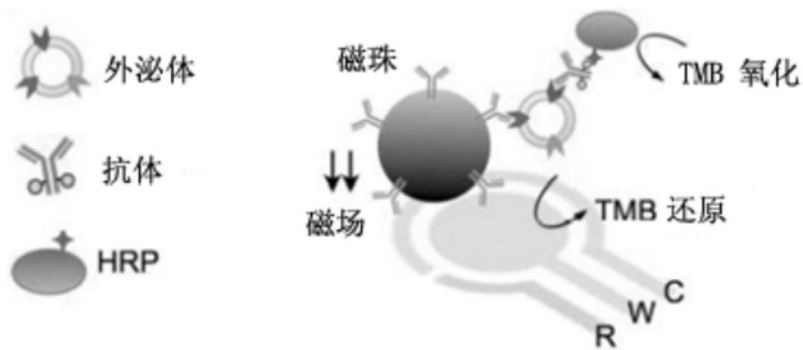


图2

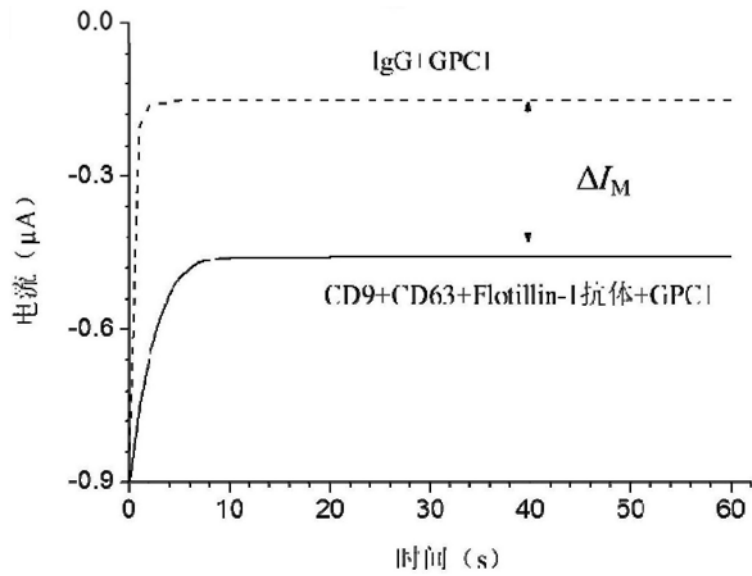


图3

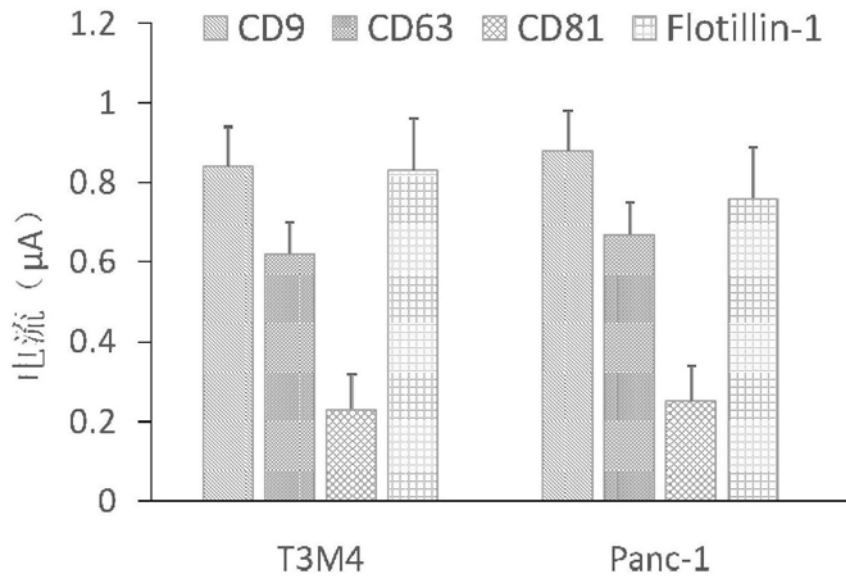


图4

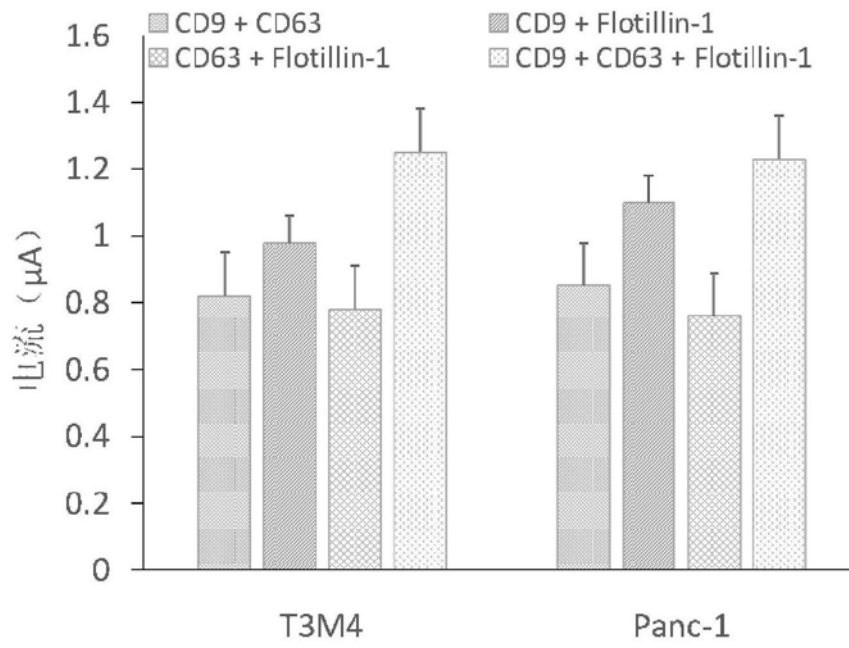


图5

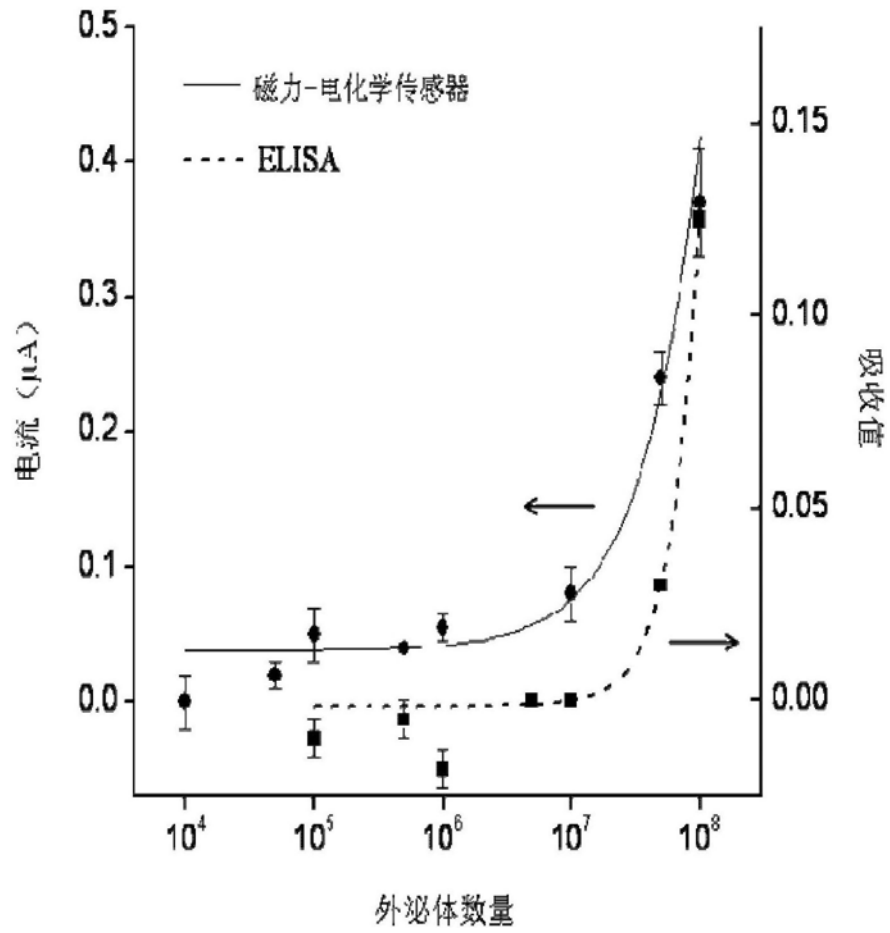


图6

专利名称(译)	一种检测外泌体GPC1蛋白的方法		
公开(公告)号	CN105974122B	公开(公告)日	2018-09-28
申请号	CN201610296295.0	申请日	2016-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	华东医药(杭州)基因科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	华东医药(杭州)基因科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	华东医药(杭州)基因科技有限公司		
[标]发明人	相双红 凌志强 宋小慧 叶慧		
发明人	相双红 凌志强 宋小慧 叶慧		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N27/26		
CPC分类号	G01N27/26 G01N33/531 G01N33/689		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN105974122A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测外泌体GPC1蛋白的方法，所述方法包括以下步骤：(1)取待测样品；(2)向待测样品中加入修饰有外泌体特异性抗体的免疫磁珠；(3)依次加入生物素标记的抗GPC1抗体、链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶和辣根过氧化物酶的底物；(4)使用磁力-电化学传感器装置进行检测。本发明方法结合了免疫磁珠技术与电化学传感器检测技术的优点，灵敏度高、所需样本量少，同时检测所用设备成本低、小型化且可高通量、特异地检测表达有GPC1蛋白的特定外泌体，对癌症早期诊断和治疗检测具有重要意义。

