



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107881176 A

(43)申请公布日 2018.04.06

(21)申请号 201711135333.5

(22)申请日 2017.11.16

(71)申请人 苏州纳葛诺斯生物科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市相城区黄埭镇
安民路6号

(72)发明人 刘党培 杨蒙 刘岩磊 陈云生

(51)Int.Cl.

C12N 15/115(2010.01)

G01N 33/53(2006.01)

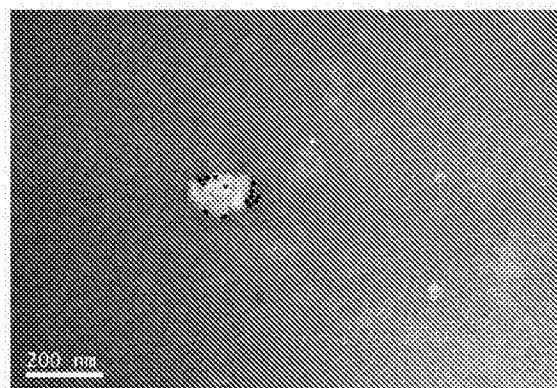
权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54)发明名称

标记外泌体的试剂及其制备方法和使用方
法

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域,公开了一种标记外泌体的试剂及其制备方法和使用方法,该试剂由巯基修饰的CD63适配体和金纳米粒子组成,二者的摩尔比为50~100:1;其制备方法是使用巯基修饰的CD63适配体修饰金纳米粒子得所述标记外泌体的试剂;其中,巯基修饰的CD63适配体与金纳米粒子之间的摩尔比为50~100:1;其使用方法是在室温下将标记外泌体的试剂与待标记外泌体混合搅拌2h;其中,标记外泌体的试剂与待标记外泌体之间的体积比为1:20~50。本发明不仅能够实现标记外泌体的目的,而且由于巯基修饰的CD63适配体价格低廉,能够有效降低实验成本,且该适配体容易保存、不易变质。



1. 一种标记外泌体的试剂，其特征在于，由巯基修饰的CD63适配体和金纳米粒子组成，二者的摩尔比为50~100:1。

2. 根据权利要求1所述的标记外泌体的试剂，其特征在于，所述金纳米粒子的粒径为5~20nm。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫金标记外泌体的方法，其特征在于，所述巯基修饰的CD63适配体的核酸序列为5`SH C6 CACCCCACCTCGCTCCGTGACACTAATGCTA。

4. 一种如权利要求1至3中任一项所述的标记外泌体的试剂的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

使用所述巯基修饰的CD63适配体修饰所述金纳米粒子得所述标记外泌体的试剂；

其中，所述巯基修饰的CD63适配体与所述金纳米粒子之间的摩尔比为50~100:1。

5. 根据权利要求4所述的标记外泌体的试剂的制备方法，其特征在于，使用所述巯基修饰的CD63适配体修饰所述金纳米粒子的具体方法如下：

室温下将所述巯基修饰的CD63适配体与所述金纳米粒子混合搅拌12h。

6. 根据权利要求4所述的标记外泌体的试剂的制备方法，其特征在于，所述金纳米粒子采用氯金酸还原法合成。

7. 根据权利要求6所述的标记外泌体的试剂的制备方法，其特征在于，所述氯金酸还原法中采用的还原剂为柠檬酸钠、鞣酸、抗坏血酸、白磷或硼氢化钠。

8. 根据权利要求4至7中任一项所述的标记外泌体的试剂的制备方法，其特征在于，所述金纳米粒子的粒径为5~20nm。

9. 根据权利要求4至7中任一项所述的标记外泌体的试剂的制备方法，其特征在于，所述巯基修饰的CD63适配体的核酸序列为5`SH C6 CACCCCACCTCGCTCCGTGACACTAATGCTA。

10. 一种如权利要求1至3中任一项所述的标记外泌体的试剂的使用方法，其特征在于，包括以下步骤：

室温下将所述标记外泌体的试剂与待标记外泌体混合搅拌2h；

其中，所述标记外泌体的试剂与所述待标记外泌体之间的体积比为1:20~50。

标记外泌体的试剂及其制备方法和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及一种标记外泌体的试剂及其制备方法和使用方法。

背景技术

[0002] 外泌体(exosome)是一种很多细胞都能分泌的直径约30~150nm的包含有多种蛋白质和RNA的膜性囊泡,具有在细胞之间传递信息的功能。目前研究表明外泌体在疾病诊断和治疗中发挥着重要作用(María Yáñez-Mó et al. Journal of Extracellular Vesicles, 2015;4:1, 27066)。

[0003] 外泌体的研究中,首先需要对分离得到的外泌体进行表征(Théry C et al. Curr Protoc Cell Biol, 2006;3:1-29)。目前外泌体的表征方法主要有透射电子显微镜、Western Blot、Nanosight、流式检测、免疫金标记等。由于外泌体表面具有特异性的蛋白,因此可通过金纳米粒子识别特定分子的方式对外泌体进行免疫金标记。免疫金标记外泌体的一个难点是制备能标记外泌体的金纳米粒子。目前通常采用的方法是先用抗体识别特定分子,再用金纳米粒子标记的二抗识别一抗进而标记外泌体,也可采用金纳米粒子标记一抗的方式直接识别外泌体。但是抗体造价昂贵,且抗体连接金纳米粒子步骤繁多且复杂,且抗体中含有蛋白,容易变质,不易保存。

发明内容

[0004] 发明目的:针对现有技术中存在的问题,本发明提供一种标记外泌体的试剂及其制备方法和使用方法,该试剂价格低廉、不易变质且使用方法简便。

[0005] 技术方案:本发明提供了一种标记外泌体的试剂,由巯基修饰的CD63适配体和金纳米粒子组成,二者的摩尔比为50~100:1。

[0006] 优选地,所述金纳米粒子的粒径为5~20nm。

[0007] 优选地,所述巯基修饰的CD63适配体的核酸序列为5`SH-C₆CACCCCACCTCGCTCCGTGACACTAATGCTA。

[0008] 本发明还提供了一种标记外泌体的试剂的制备方法,包括以下步骤:使用所述巯基修饰的CD63适配体修饰所述金纳米粒子得所述标记外泌体的试剂;其中,所述巯基修饰的CD63适配体与所述金纳米粒子之间的摩尔比为50~100:1。

[0009] 进一步地,使用所述巯基修饰的CD63适配体修饰所述金纳米粒子的具体方法如下:室温下将所述巯基修饰的CD63适配体与所述金纳米粒子混合搅拌12h。

[0010] 优选地,所述金纳米粒子采用氯金酸还原法合成;所述氯金酸还原法中采用的还原剂为柠檬酸钠、鞣酸、抗坏血酸、白磷或硼氢化钠等;所述金纳米粒子的粒径为5~20nm。

[0011] 优选地,所述巯基修饰的CD63适配体的核酸序列为5`SH-C₆CACCCCACCTCGCTCCGTGACACTAATGCTA。

[0012] 本发明还提供了一种标记外泌体的试剂的使用方法,包括以下步骤:室温下将所

述标记外泌体的试剂与待标记外泌体混合搅拌2h;其中,所述标记外泌体的试剂与所述待标记外泌体之间的体积比为1:20~50;优选1:50。

[0013] 有益效果:核酸适配体是一小段经体外筛选得到的寡核苷酸序列,能与相应的配体进行高亲和力和强特异性的结合,具有和抗体的相似的效果,研究证实外泌体特异分子CD63的适配体能够识别外泌体,且巯基能够比较容易与金离子结合,因此本发明中采用巯基修饰的CD63适配体代替抗体连接金纳米粒子制成用于标记外泌体的试剂,不仅能够实现标记外泌体的目的,而且由于巯基修饰的CD63适配体价格低廉,能够有效降低实验成本,且该适配体容易保存、不易变质。

附图说明

[0014] 图1为合成金溶胶透射电子显微镜照片。;

图2为金纳米粒子标记的血清外泌体的透射电子显微图片;

图3为金纳米粒子标记的唾液外泌体的透射电子显微图片;

图4为金纳米粒子标记的尿液外泌体的透射电子显微图片。

具体实施方式

[0015] 下面结合附图对本发明进行详细的介绍。

[0016] 实施方式1:

本实施方式提供了一种标记外泌体的试剂,该试剂由巯基修饰的CD63适配体和金纳米粒子组成,二者的摩尔比为50:1,其中,巯基修饰的CD63适配体的核酸序列为5`SH C6 CACCCCACCTCGCTCCCGTGACACTAATGCTA。

[0017] 上述标记外泌体的试剂的制备方法如下:

一、采用柠檬酸钠还原法合成金纳米粒子,该金纳米粒子的透射电子显微镜(TEM)图片如图1,可见在视野范围内,金纳米粒子粒径大小一致,粒径在5~20nm之间。

[0018] 二、将步骤一中获得的金纳米粒子0.05mg与巯基修饰的CD63适配体0.03 μmol在室温下100 rpm搅拌12h,然后10000 rpm离心10 min去除未结合的巯基修饰的CD63适配体,得到巯基修饰的CD63适配体修饰的金纳米粒子——即标记外泌体的试剂。

[0019] 将经过上述方法制备得到标记外泌体的试剂用于标记血清外泌体时的使用方法如下:

取上述标记外泌体的试剂20 μl与血清外泌体400 μl在室温下搅拌孵育2h,得到金纳米粒子修饰的血清外泌体,该金纳米粒子修饰的血清外泌体的TEM图片如图2,可见,金纳米粒子成功结合在血清外泌体表面。

[0020] 实施方式2:

本实施方式提供了一种标记外泌体的试剂,该试剂由巯基修饰的CD63适配体和金纳米粒子组成,二者的摩尔比为80:1,其中,巯基修饰的CD63适配体的核酸序列为5`SH C6 CACCCCACCTCGCTCCCGTGACACTAATGCTA

上述标记外泌体的试剂的制备方法如下:

一、采用柠檬酸钠还原法合成金纳米粒子,该金纳米粒子的透射电子显微镜(TEM)图片如图1,可见在视野范围内,金纳米粒子粒径大小一致,粒径在5~20nm之间。

[0021] 二、将步骤一中获得的金纳米粒子0.05mg巯基修饰的CD63适配体0.05 μmol在室温下100 rpm搅拌12h,然后10000 rpm离心10 min去除未结合的巯基修饰的CD63适配体,得到巯基修饰的CD63适配体修饰的金纳米粒子——即标记外泌体的试剂。

[0022] 将经过上述方法制备得到标记外泌体的试剂用于标记唾液外泌体时的使用方法如下:

取步上述标记外泌体的试剂 10 μl与唾液外泌体400 μl在室温下搅拌孵育2h,得到金纳米粒子修饰的唾液外泌体,该金纳米粒子修饰的唾液外泌体的TEM图片如图3,可见,金纳米粒子成功结合在唾液外泌体表面。

[0023] 实施方式3:

本实施方式提供了一种标记外泌体的试剂,该试剂由巯基修饰的CD63适配体和金纳米粒子组成,二者的摩尔比为100:1,其中,巯基修饰的CD63适配体的核酸序列为5`SH C6 CACCCCACCTCGCTCCCGTGACACTAATGCTA。

[0024] 上述标记外泌体的试剂的制备方法如下:

一、采用柠檬酸钠还原法合成金纳米粒子,该金纳米粒子的透射电子显微镜(TEM)图片如图1,可见在视野范围内,金纳米粒子粒径大小一致,粒径在5~20nm之间。

[0025] 二、将步骤一中获得的金纳米粒子0.05 mg与巯基修饰的CD63适配体0.06μmol 在室温下100 rpm搅拌12h,然后10000 rpm离心10 min去除未结合的巯基修饰的CD63适配体,得到巯基修饰的CD63适配体修饰的金纳米粒子——即标记外泌体的试剂。

[0026] 将经过上述方法制备得到标记外泌体的试剂用于标记尿液外泌体时的使用方法如下:

取步上述标记外泌体的试剂10 μl与尿液外泌体0.5 ml 在室温下搅拌孵育2h,得到金纳米粒子修饰的尿液外泌体,该金纳米粒子修饰的尿液外泌体的TEM图片如图4,可见,金纳米粒子成功结合在尿液外泌体表面。

[0027] 上述实施方式只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明精神实质所做的等效变换或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

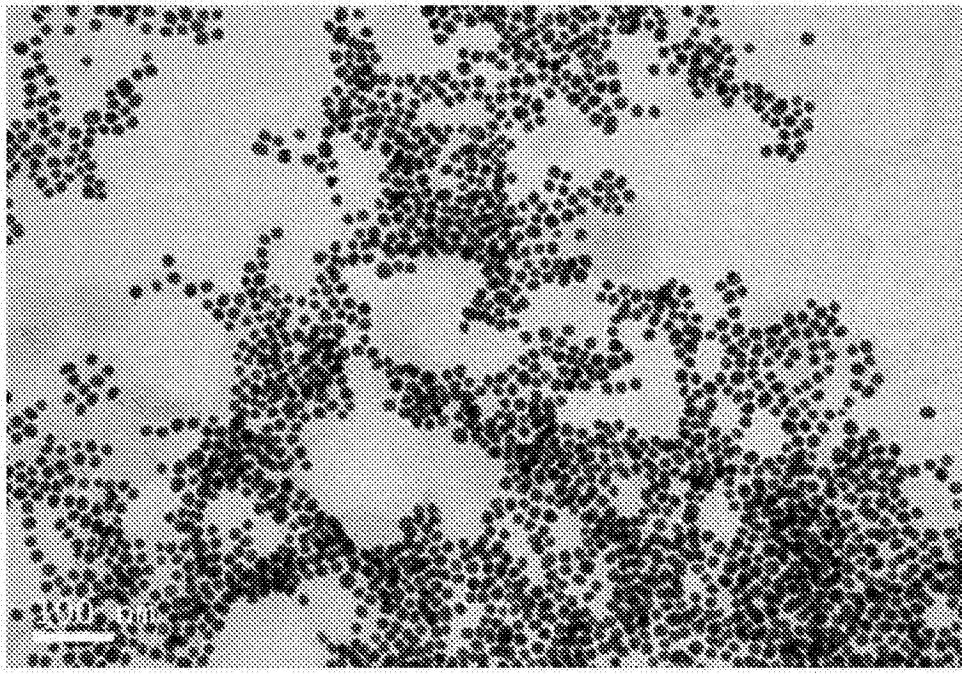


图1

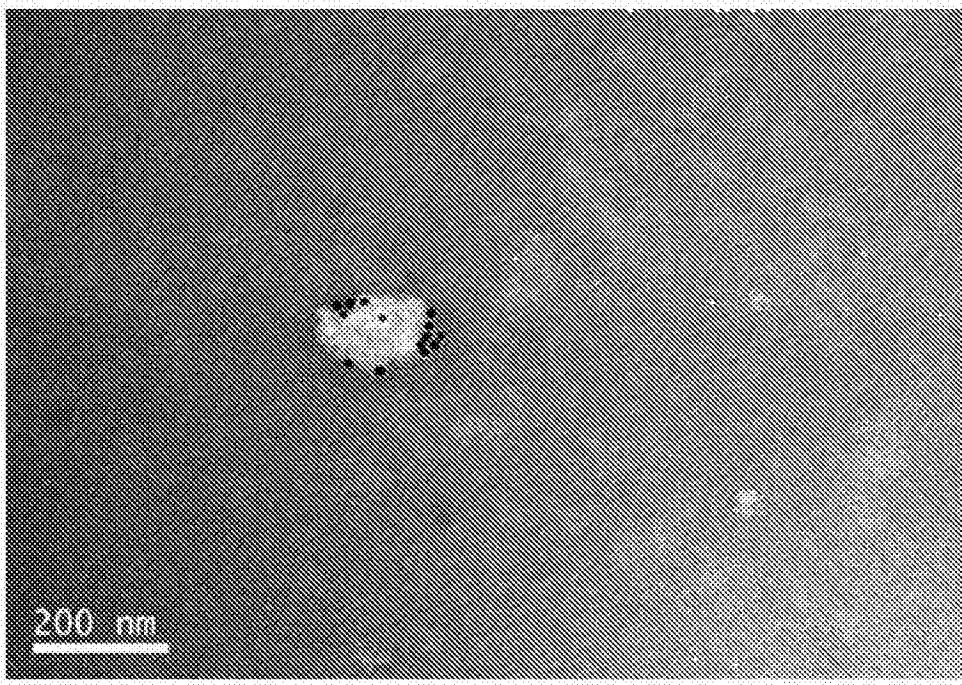


图2

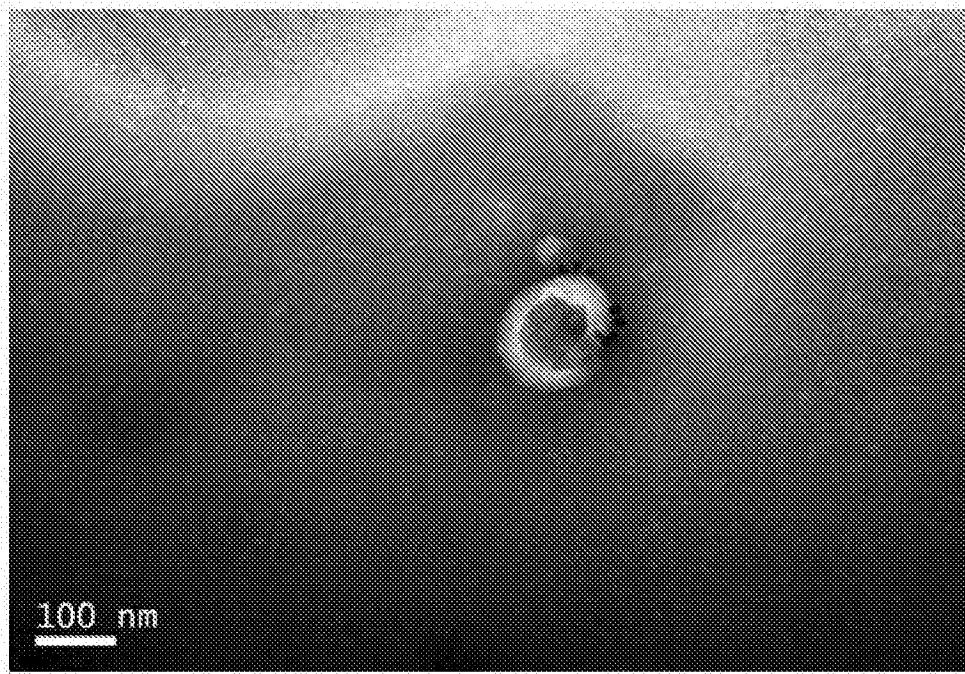


图3

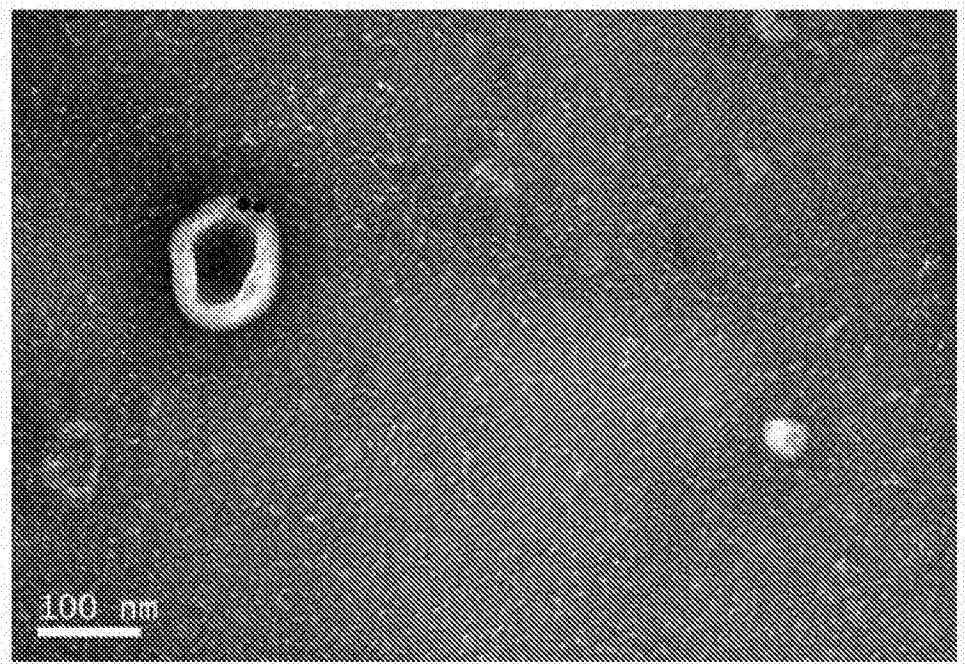


图4

专利名称(译)	标记外泌体的试剂及其制备方法和使用方法		
公开(公告)号	CN107881176A	公开(公告)日	2018-04-06
申请号	CN201711135333.5	申请日	2017-11-16
[标]发明人	刘党培 杨蒙 刘岩磊 陈云生		
发明人	刘党培 杨蒙 刘岩磊 陈云生		
IPC分类号	C12N15/115 G01N33/53		
CPC分类号	C12N15/115 C12N2310/16 C12N2310/31 G01N33/5308		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，公开了一种标记外泌体的试剂及其制备方法和使用方法，该试剂由巯基修饰的CD63适配体和金纳米粒子组成，二者的摩尔比为50~100:1；其制备方法是使用巯基修饰的CD63适配体修饰金纳米粒子得所述标记外泌体的试剂；其中，巯基修饰的CD63适配体与金纳米粒子之间的摩尔比为50~100:1；其使用方法是在室温下将标记外泌体的试剂与待标记外泌体混合搅拌2h；其中，标记外泌体的试剂与待标记外泌体之间的体积比为1:20~50。本发明不仅能够实现标记外泌体的目的，而且由于巯基修饰的CD63适配体价格低廉，能够有效降低实验成本，且该适配体容易保存、不易变质。

