(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110869764 A
(43)申请公布日 2020.03.06

(21)申请号 201880031733.8

(22)申请日 2018.05.16

(30)优先权数据
102017005543.2 2017.06.13 DE

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.11.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/DE2018/000145 2018.05.16

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/228625 DE 2018.12.20

(71)申请人 于利奇研究中心有限公司
地址 德国于利奇

(72)发明人 C.扎菲乌 D.维尔博尔德
A.库拉维克 O.班纳赫

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 张华 梅黎

(51)Int.Cl.
G01N 33/50(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

用于检测样品中的细胞外囊泡的方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于检测样品中的细胞外囊泡的方法,包括以下步骤:a)将样品施加到基底上,b)添加适合于检测的探针,所述探针通过特异性结合至细胞外囊泡上来标记它们,和c)通过测量探针的特异性信号检测所述细胞外囊泡,其中步骤b)可以在步骤a)之前实施。公开了用于实施该基底的试剂盒。

CN 110869764 A

1.用于检测样品中的细胞外囊泡的方法,包括以下步骤:

a) 将样品施加到基底上,

b) 添加适合于检测的探针,所述探针通过特异性结合至细胞外囊泡上来标记它们,和

c) 通过测量探针的特异性信号检测所述细胞外囊泡,其中步骤b)可以在步骤a)之前进行。

2.根据前述权利要求所述的方法,

其特征在于,

在步骤a)之前,将用于细胞外囊泡的捕获剂分子固定在基质上。

3.根据前述权利要求所述的方法,

其特征在于,

通过使所述细胞外囊泡与所述捕获剂分子接触,使其通过结合至所述捕获剂分子上而固定在基底上。

4.根据前述权利要求中任一项所述的方法,

其特征在于,

在使细胞外囊泡与探针接触之后,通过洗涤除去没有特异性结合的分子和颗粒。

5.根据前述权利要求中任一项所述的方法,

其特征在于,

选择结合至细胞外囊泡上的探针,其中所述探针能够发射特异性信号。

6.根据前述权利要求中任一项所述的方法,

其特征在于,

使细胞外囊泡与捕获剂分子和探针同时接触。

7.根据前述权利要求中任一项所述的方法,

其特征在于,

在与捕获剂分子接触之前,使细胞外囊泡与探针接触。

8.根据前述权利要求中任一项所述的方法,

其特征在于,

在使探针结合至细胞外囊泡上之前将样品固定。

9.根据前述权利要求中任一项所述的方法,

其特征在于,

用洗涤剂处理样品。

10.根据前述权利要求中任一项所述的方法,

其特征在于,

位置分辨地确定探针信号。

11.根据前述权利要求中任一项所述的方法

其特征在于,

所述基底包含塑料、硅或二氧化硅,优选玻璃。

12.根据前述权利要求中任一项所述的方法,

其特征在于,

在将捕获剂分子固定在基底上之前,基底具有亲水性表面。

13.根据前述权利要求所述的方法，
其特征在于，
亲水性层选自包含PEG、聚赖氨酸和糊精或其衍生物的组或者由其组成的组。
14.根据前述权利要求中任一项所述的方法，
其特征在于，
通过使基底与APTES (3-氨基丙基三氧基硅烷)或乙醇胺接触来用氨基官能化。
15.根据前述权利要求中任一项所述的方法，
其特征在于，
使基底与APTES (3-氨基丙基三氧基硅烷)在气相中接触。
16.根据前述权利要求中任一项所述的方法
其特征在于，
捕获剂分子共价结合至基底上或涂层上。
17.根据前述权利要求中任一项所述的方法
其特征在于，
细胞外囊泡的结合位点是表位，并且捕获剂分子和探针是抗体或其部分本身。
18.根据前述权利要求中任一项所述的方法，
其特征在于，
所述探针是用荧光染料标记的。
19.根据前述权利要求中任一项所述的方法
其特征在于，
所述检测借助于位置分辨的荧光显微术进行。
20.用于实施前述权利要求中任一项所述的方法的试剂盒，其包含：
- 基底，其任选具有亲水性表面和/或被固定的捕获剂分子；
- 探针；
- 任选的溶液和缓冲液。

用于检测样品中的细胞外囊泡的方法

[0001] 本发明涉及用于检测样品中的细胞外囊泡的方法。

背景技术

[0002] 细胞外囊泡(EV)是可以由几乎每个细胞分泌并由大量细胞再摄取的膜颗粒。这些囊泡可以将信息从一个细胞传递到另一个细胞。细胞外囊泡被划分为三类:外泌体,其具有小于100 nm的直径,其来源于细胞内部中的内体。较大的微颗粒(100-1000 nm),其直接从细胞膜脱离。细胞外囊泡的第三类是在细胞凋亡期间产生的囊泡。该囊泡可由不同的因素产生,例如细胞外刺激、微生物感染和其它应激因素。细胞外囊泡由其中结合了膜蛋白的脂质双层和内部中的溶液组成。

[0003] 在细胞外囊泡的内部中可以存在例如蛋白质、DNA和/或RNA,其被称为货物。一些少量的蛋白质在所有细胞外囊泡中重新找到,并且独立于细胞类型被分泌[1]。这些包括在细胞内部中发现的蛋白质,例如肌动蛋白和微管蛋白,但也包括膜蛋白,如四跨膜蛋白CD9、CD63和CD81以及I类组织相容性复合物(MHC I)[1, 2]。在完全确定的细胞类型中重新找到其它蛋白质、DNA-和/或RNA-片段[3]。

[0004] 细胞外囊泡的生物学角色是复杂的并且还未完全搞清楚。目前已知,细胞外囊泡此外可以从细胞中排除不希望的蛋白质,但也可以在细胞-细胞通讯中发挥作用,例如在刺激免疫系统的情况下[1]。这些囊泡在一些危及生命的疾病如心血管疾病、肾疾病中和在许多癌症中也起着重要作用,并且可以直接指示特定的疾病[3-6]。由于细胞外囊泡被细胞释放到周围的介质中并也经肾脏排泄,因此在体液如血液、脑脊液中以及在尿液中找到它们,它们在这些体液中被检测到并且能够提供有关疾病的信息而无需进行活检[3, 7]。

[0005] 另一个应用领域是使用由癌细胞分泌的细胞外囊泡。这些可以用作疫苗[8]。因此,一方面可以实现对危险患者的免疫接种,另一方面可以由此制备生物制药活性物质,例如抗体,并且用于治疗目的。也考虑直接使用外泌体用于治疗目的[7]。

[0006] 在细胞外囊泡的检测和表征中的黄金标准是电子显微镜技术,其中低温透射电子显微术是最灵敏的技术。该方法提供了对细胞外囊泡的尺寸分布的最高分辨率和最准确的报告,并且也可以用免疫染色来表征细胞外囊泡。不利的是,样品准备困难,测量极其费时并且该方法总体上非常昂贵。此外,其需要良好训练的人员,因此其既不适合于绝对定量,也不适合于常规诊断[9]。

[0007] 用于分析细胞外囊泡的最广泛使用的方法是流式细胞术(FCM),其由大都稀释的样品中借助于光学性质在流过检测器时识别和计数各个囊泡和细胞。在其标准实施方案中,流式细胞术借助于折射率通过光散射进行分类和计数。虽然散射强度也能够给出关于各个颗粒的尺寸的信息,但是检测下限不利地为大约400 nm。在一个改进的版本中,另外用荧光标记过的抗体标记细胞外囊泡,并且除了光散射之外也评估荧光信号。优点在于,可以表征细胞外囊泡,并且尺寸分辨率极限降至约100 nm。在最新的流式细胞术中,用照相机记录荧光信号,并且可以激发不同的波长,由此存在检测不同类型的细胞外囊泡的可能性。然而,该技术的缺点在于,在流中始终只能将一个特性归于某一特定的囊泡,从而只要没有费

力地除去介质中的残余物，该方法也一起检测来自介质的残余物。此外，在图像辅助的流式细胞术中，分辨率下限也为100 nm下[9]。

[0008] 在与FCM结合的电阻脉冲方法(RPS)中，样品溶液流过两个电极之间的在其上施加电压的孔。通过的颗粒增加电极之间的电阻，由此可以计数颗粒。这种方法可达到的检测下限为40 nm并且取决于孔直径。不利的是，该孔可能堵塞，并且可能难以找到最佳设置，以对具有非均匀尺寸分布的样品中的所有颗粒进行计数。此外，用该方法不能表征细胞外囊泡[10]。

[0009] 也可以使用动态光散射(DLS) 。虽然其可以简单地操作并且具有直至5-10 nm的检测下限，但是该方法不适用于定量细胞外囊泡。伪影也可能干扰[9]。

[0010] 在纳米颗粒跟踪分析(NTA)中，通过光散射跟踪颗粒运动并且用照相机记录。从获得的数据中可以得出关于尺寸分布及其浓度的结论。一些仪器配备有荧光检测系统，其允许也跟踪经标记的细胞外囊泡。然而，在不均匀的尺寸分布的情况下，样品必须以不同的稀释来测量。检测下限为50 nm[9]。

[0011] 现有技术中的一些方法不能覆盖外泌体的整个的或决定性的(30-100 nm)尺寸范围，由此低估了细胞外囊泡的实际数量并丢失了重要信息。

[0012] 根据现有技术的方法的决定性的缺点在于，必须费力地清洁样品，以便能够实施检测。用该方法也不能明确地区分，所测量的颗粒是否是外泌体、微颗粒或微囊泡或者是来自样品基质的其它囊泡或颗粒[11]。

[0013] 发明目的

因此，本发明的目的是提供一种用于检测任意样品中的细胞外囊泡的方法，所述样品例如是体液如血浆、血清、尿液、脑脊液以及细胞培养上清液。

[0014] 本发明的另一个目的是提供一种用于实施检测的试剂盒。

[0015] 所述目的的解决方案

所述目的用主权利要求的方法和根据从属权利要求的试剂盒得以实现。对此的有利实施方案各自由与其相关(hierauf rückbezogenen)的专利权利要求获悉。

发明内容

[0016] 所述目的通过用于检测样品中的细胞外囊泡的方法得以实现，该方法包括以下步骤：

a) 将样品施加到基底上，

b) 添加适合于检测的探针，所述探针通过特异性结合至细胞外囊泡上来标记它们，和

c) 通过测量探针的特异性信号检测所述细胞外囊泡，其中步骤b)可以在步骤a)之前进行。

[0017] 由此实现了本发明的目的。

[0018] 在本发明的一个实施方案中，所述方法的特征在于，在步骤a)之前将用于细胞外囊泡的捕获剂分子(Fängermolekülen)固定在基底上。

[0019] 在本发明和根据本发明的方法的另一实施方案中，通过使细胞外囊泡与捕获剂分子接触，将它们通过结合至捕获剂分子上而固定在基底上。

[0020] 在本发明和根据本发明的方法的另一实施方案中，在使细胞外囊泡与探针接触之

后,通过洗涤除去未特异性结合的分子和颗粒。

[0021] 可以有利地选择结合至细胞外囊泡上的探针,其中所述探针例如也可以在结合之后才发射出特异性信号。

[0022] 可以使细胞外囊泡同时与捕获剂分子和探针接触。

[0023] 细胞外囊泡与探针的接触也可以在与捕获剂分子接触之前进行。

[0024] 该方法能够有利地确定细胞外囊泡的尺寸分布,尤其是在对于外泌体而言的10-100 nm和对于微颗粒而言的100-1000 nm的尺寸范围内,如下所示。

[0025] 用该方法成功地检测了任意样品中的细胞外囊泡和以小数目的细胞外囊泡。因此,也可以进行单个检测(Einzelnachweise),而不必费力地清洁样品。

[0026] 此外,该方法可以有利地使得细胞外囊泡的定性检测成为可能,以及在任意样品中的定量和表征。由此,一方面有利地确保了细胞外囊泡数目的直接和绝对的定量,另一方面有利地确保了细胞外囊泡的尺寸分布的表征。

[0027] 该表征也可以借助于囊泡内部中的蛋白质、DNA和RNA的定量和识别和/或借助于膜蛋白来进行。

[0028] 因此,所述检测直接在任意样品上以简单的步骤进行。术语"任意样品"也指具有不同添加剂或培养介质的缓冲液。此外,样品可以在体外从体液中提取或者是体液。可以直接研究来自环境的样品,例如水-、植物-和土壤样品的样品,以及食物,并检测细胞外囊泡。

[0029] 根据本发明的方法的一个特别的变体是定量和/或定性测定细胞外囊泡,所述细胞外囊泡包含至少一个用于捕获剂分子的结合位点和至少一个用于探针的结合位点。该方法包括以下步骤:

用于定量和/或定性测定细胞外囊泡的方法,所述细胞外囊泡包含至少一个用于捕获剂分子的结合位点和至少一个用于探针的结合位点,所述方法包括以下步骤:

a) 将捕获剂分子固定在基底上,

b) 使细胞外囊泡与捕获剂分子接触,

c) 通过结合至捕获剂分子上将所述细胞外囊泡固定在基底上,

d) 使细胞外囊泡与探针接触,和

e) 除去未特异性结合的分子和颗粒,例如通过洗涤,

f) 将所述探针结合至细胞外囊泡上,

其中,所述探针能够发射特异性信号,并且步骤b)和d)可同时进行或者d)先于b)进行。

[0030] 因此,步骤c)和f)也可以有利地同时进行。

[0031] 在该方法的另一个变体中,其中在使细胞外囊泡与捕获剂分子接触之前使细胞外囊泡与探针接触,因此用探针标记的细胞外囊泡固定在基底上。

[0032] 因此,在使细胞外囊泡与捕获剂分子接触并固定在基底上之前,将探针结合至细胞外囊泡上。

[0033] 在该方法的另一个变体中,在使细胞外囊泡与探针接触之后,将样品化学固定,例如通过甲醛。

[0034] 任选地,在将探针结合至细胞外囊泡上之后或期间或之前,可以将样品另外与结合DNA和RNA的探针混合。

[0035] 在本发明的一个实施方案中,在化学固定之后使用洗涤剂,以使细胞外囊泡的膜

可渗透，并且例如在将探针结合至细胞外囊泡上期间，探针可深入到细胞外囊泡的内部中。

[0036] 在本发明的意义上，"定量测定"首先表示测定细胞外囊泡的浓度，因此也就表示确定其存在和/或不存在。

[0037] 优选地，定量测定也表示选择性定量细胞外囊泡的特定类型。这种定量可以通过相应的特异性探针来检测。

[0038] 在本发明的意义上，"定性测定"表示表征细胞外囊泡。

[0039] 用一个或多个可用于检测的和/或特异性的探针标记细胞外囊泡。所述探针包含识别细胞外囊泡的结合位点并且结合至其上的亲和分子。此外，所述探针包含至少一种检测分子或分子部分，其共价结合至细胞外囊泡亲和分子或分子部分，并且可借助于化学或物理方法来检测和测量。

[0040] 在本发明的一个实施方案中，探针可以具有相同的亲和分子或分子部分与不同的检测分子(或部分)。在另一替代方案中，不同的亲和分子或分子部分可以与不同的检测分子或部分组合，或者替代地，不同的亲和分子或部分可以与相同的检测分子或部分组合。

[0041] 也可以使用不同探针的混合物。

[0042] 与不同的检测分子或分子部分偶联的多个不同的探针的使用，一方面增加了信号(相关信号)的特异性，另一方面使得在一个或多个特征上不同的细胞外囊泡的识别成为可能。这使得细胞外囊泡的选择性定量和表征成为可能。

[0043] 在一个实施方案中，位置分辨地(ortsaufgelöst)确定探针信号，即位置分辨地检测由探针发射的信号。因此，在本发明的这个实施方案中，排除了基于非位置分辨的信号的方法，如ELISA或三明治-ELISA。

[0044] 在检测时，高的位置分辨率是有利的。在根据本发明的方法的一个实施方案中，在这种情况下收集如此多的数据点，使得可以先于背景信号检测细胞外囊泡，所述背景信号例如由仪器特异性噪声、其它非特异性信号或非特异性结合的探针造成。以这种方式，读取了与存在的位置分辨事件例如像素一样多的值(读出值)。通过位置分辨，先于各自的背景确定每个事件，因此相对于没有位置分辨的信号的ELISA-方法是一个优点。

[0045] 在一个实施方案中，探针信号的位置分辨的确定基于全内反射荧光微显微镜(tirfm)和与样品体积相比小体积元素的研究，在几飞升至1飞升以下的范围内，或者在高度为500nm，优选300nm，特别优选250nm，特别是200nm的捕获剂分子的接触表面以上的体积范围的。

[0046] 在本发明的意义上，检测细胞外囊泡，所述细胞外囊泡选自包含外泌体和/或微颗粒的组或由其组成的组。

[0047] 在一个实施方案中，基底的材料选自包含塑料、硅和二氧化硅的组或由其组成的组。在一个优选的替代方案中，使用玻璃作为基底。

[0048] 在本发明的另一个实施方案中，捕获剂分子共价结合至基底上。

[0049] 为此，在一个替代方案中使用具有亲水性表面的基底。在一个替代方案中，这通过，仍然在步骤a)之前，在基底上施加亲水性层来实现。因此，捕获剂分子结合，特别是共价结合至基底上或与用其加载基底的亲水性层上。

[0050] 亲水性层是生物分子排斥层，因此有利地使生物分子非特异性结合至基底上最小化。在该层上，捕获剂分子，优选共价固定。这些对细胞外囊泡的特征亲和。捕获剂分子可以

全部相同,或者可以存在不同捕获剂分子的混合物。

[0051] 在一个替代方案中,使用相同的分子作为捕获剂分子和探针。优选地,捕获剂分子不包含适合于检测的检测分子或分子部分。

[0052] 在一个实施方案中,亲水性层选自包含聚乙二醇、聚赖氨酸,优选聚-D-赖氨酸,和糊精或其衍生物,优选羧甲基糊精(CMD)的组或由其组成的组。在本发明的意义上的衍生物是在一些取代基上不同于母体化合物的化合物,其中所述取代基对于根据本发明的方法是惰性的。

[0053] 在本发明的一个实施方案中,在施加亲水性层之前,首先将基底的表面羟基化,然后用氨基活化。在一个替代方案中,用氨基活化通过使基底与APTES (3-氨基丙基三乙氧基硅烷)或与乙醇胺接触来进行。

[0054] 为了使基底对涂层有准备,进行以下步骤中的一个或多个:

● 在超声波浴或等离子清洁器中洗涤由玻璃或玻璃载体制成的基底,替代于此在5 M NaOH中孵育至少3小时,

● 用水冲洗,然后在氮气下干燥,

● 浸入比例为3:1的浓硫酸和过氧化氢的溶液中用于活化羟基,

● 用水冲洗,直至中性pH,随后用乙醇冲洗并在氮气气氛下干燥,

● 浸入具有3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES) (1-7%),优选在干燥甲苯中的溶液或乙醇胺的溶液中,

● 用丙酮或DMSO和水冲洗并在氮气气氛下干燥。

[0055] 在一个替代方案中,使基底与APTES在气相中接触;因此,用APTES蒸镀任选预处理过的基底。

[0056] 对于具有糊精、优选羧甲基糊精(CMD)的涂层,将基底用浓度为10 mg/ml或20 mg/ml的CMD的水溶液和任选N-乙基-N-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、(200 mM)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、(50 mM)温育并随后洗涤。

[0057] 在一个变体中,羧甲基糊精共价结合至玻璃表面上,所述玻璃表面首先被羟基化,然后用氨基官能化。

[0058] 作为基底也可以使用微量滴定板,优选具有玻璃底部。因为在使用聚苯乙烯框架时不能使用浓硫酸,所以在本发明的一个实施方案变体中玻璃表面的活化类似地进行。

[0059] 在该亲水性层上,优选共价地,固定捕获剂分子,其对待检测的细胞外囊泡的特征亲和。所述特征可以是蛋白质。捕获剂分子可以全部相同或者是不同捕获剂分子的混合物。

[0060] 在本发明的一个实施方案中,任选在活化用CMD涂覆的载体之后,通过EDC/NHS 的混合物(200或50 mM)将捕获剂分子,优选抗体,固定在基底上。

[0061] 没有捕获剂分子结合至其上的残留的羧酸酯端基可以被失活。使用乙醇胺用于使CMD间隔物上的这些羧酸酯端基失活。在施加样品之前,任选用缓冲液冲洗基底或载体。

[0062] 使待测量的样品与如此制备的基底接触,并且任选地温育。作为待研究的样品,可以使用内生的液体或组织。在本发明的一个实施方案中,样品选自:脑脊液(CSF)、血液、血浆和尿液。样品可以经历本领域技术人员已知的不同的后处理步骤。

[0063] 在本发明的一个实施方案中,将样品直接施加在基底上,例如未涂覆的基底上,任选地通过共价结合。任选地,结合至基底的活化表面上。

[0064] 在本发明的一个变体中，样品的预处理根据一个或多个下述方法步骤进行：

- 用水或缓冲液稀释，
- 用酶，例如蛋白酶、核酸酶、脂肪酶处理，
- 离心，
- 沉淀，
- 用探针竞争，以排挤掉可能存在的抗体。

[0065] 优选地，使样品直接与基底接触和/或在没有预处理的情况下与基底接触。

[0066] 非特异性结合的物质可以通过洗涤步骤除去。

[0067] 在另一个步骤中，用一个或多个用于进一步检测的探针标记被固定的细胞外囊泡。如上所述，各个步骤也可以以另一顺序根据本发明地来实施。

[0068] 通过合适的洗涤步骤，除去未结合至细胞外囊泡上的过量探针。

[0069] 在该方法的一个替代方案中，这些过量的探针没有被除去。由此，取消了洗涤步骤并且也没有发生在细胞外囊泡-探针-复合物或-化合物的解离方向上的平衡移动。通过位置分辨检测，在评估时没有包括过量的探针。

[0070] 在一个实施方案中，细胞外囊泡的结合位点是表位，和捕获剂分子和探针是抗体和/或抗体部分和/或其片段。在本发明的一个变体中，捕获剂分子和探针可以是相同的。

[0071] 在本发明的一个实施方案中，捕获剂分子和探针不同。因此，可以使用例如不同的抗体和/或抗体部分和/或片段作为捕获剂分子和作为探针。在本发明的另一个实施方案中，使用除可能的(染料)标记之外彼此相同的捕获剂分子和探针。

[0072] 在本发明的另一个实施方案中，同时使用不同的探针。

[0073] 在本发明的另一个替代方案中，使用至少两种或更多种不同的捕获剂分子和/或探针，其例如包含不同的抗体，并且任选地也带有不同的染料标记。

[0074] 为了检测，如此标记探针，使得它们发出可光学检测的信号，该信号选自荧光-、生物发光-和化学发光-发射以及吸收。

[0075] 在一个替代方案中，探针因此是用荧光染料标记的。作为荧光染料，可以使用本领域技术人员已知的染料。替代地，可以使用GFP (绿色荧光蛋白)、其缀合物和/或融合蛋白，以及量子点。

[0076] 为了表面的品质控制，例如在检测具有捕获剂分子的涂层的均匀性时，可以使用用荧光染料标记的捕获剂分子。

[0077] 为此，优选使用一种不被在细胞外囊泡处检测探针的荧光染料干扰的染料。由此，结构的事后控制以及测量结果的标准化变得可行。

[0078] 被固定的且标记的细胞外囊泡的检测借助于表面的成像，例如用激光扫描显微术，来进行。尽可能高的位置分辨率确定了大量的像点，由此可以提高该方法的灵敏度以及选择性，因为可以一起成像和分析结构特征。因此，特异性信号先于背景信号(例如，非特异性结合的探针)增加。

[0079] 该检测例如优选用位置分辨的荧光-显微术通过TIRF-显微镜，以及其相应的超分辨变体，例如STORM、dSTORM进行。

[0080] 在本发明的一个实施方案中，为此使用激光聚焦(例如其在激光-扫描-显微术中使用的)或FCS (荧光相关光谱系统)，以及相应的超分辨变体例如STED、PALM或SIM。

[0081] 与ELISA不同，通过这些方法产生了与存在的位置分辨事件(例如，像素)一样多的读出值。取决于不同探针的数目，有利地将信息倍增。该倍增对于每个检测事件都是有效的，并且导致信息增益(Informationsgewinn)，因为它公开了关于细胞外囊泡的进一步特性，例如第二特征。通过这样的结构，可以针对每个事件增加信号的特异性。

[0082] 可以如此选择探针，使得各个细胞外囊泡-特征例如各个膜蛋白的存在不影响测量结果。

[0083] 可以如此选择探针，使得可以针对每个单独的细胞外囊泡确定细胞外囊泡物种(表型)。

[0084] 可以如此选择另外的探针，使得它们可以区分包含DNA/RNA的细胞外囊泡，并且从而提供关于细胞外囊泡的内部的信息。例如，为此可以使用结合DNA/RNA的荧光团，如Hoechst的DAPI。

[0085] 为了评估，考虑所有使用的和检测的探针的位置分辨信息，例如荧光-强度，以确定例如细胞外囊泡的数目、其尺寸及其特征。

[0086] 在此，例如也可以应用背景最小化的算法和/或强度-阈值用于进一步评估以及模式识别。

[0087] 进一步的图像分析-选择可能性包含例如寻找局部强度最大值，以能够从图像信息中获得所检测的细胞外囊泡的数量并且也能够确定颗粒尺寸。

[0088] 为了使测试结果在距离、时间和实验者方面彼此可比较，可以使用内部和/或外部标准物。

[0089] 本发明的主题也是纳米颗粒标准物，其具有给定的尺寸，并且优选共价地带有待研究的细胞外囊泡的表面特征。

[0090] 所述标准物优选是二氧化硅纳米颗粒，但也可以是塑料纳米颗粒。

[0091] 本发明的主题也是试剂盒，其包含一个或多个以下组元：

- 基底，任选具有亲水性表面，
- 捕获剂分子，
- 探针，
- 具有捕获剂分子的基底，
- 溶液，
- 标准物，
- 缓冲液。

[0092] 本发明的试剂盒的化合物和/或组元可以包装在多个容器中，任选地与缓冲液和/或溶液一起/在缓冲液和/或溶液中。

[0093] 替代地，一些组元可以被包装在同一容器中。另外地或替代于此地，所述组元中的一种或多种可以被吸收在固体载体，例如玻璃板、芯片或尼龙膜上，或吸收在微量滴定板的孔上。因此，所述基底包括这样的微量滴定板。

[0094] 此外，所述试剂盒可以包含用于所述实施方案中的任意一种的试剂盒的使用说明书。

[0095] 在试剂盒的另一变体中，上述捕获剂分子是已经固定在基质上的。另外，试剂盒可以包含溶液和/或缓冲液。为了保护涂层和/或固定在其上的捕获剂分子，它们可以被溶液

或缓冲液覆盖地存在。

[0096] 本发明的另一主题是根据本发明的方法在检测任意样品中的细胞外囊泡以定量并由此滴定确定细胞外囊泡中的用途。

[0097] 因此,所述方法也可以有利地提供疾病例如心血管-、肾脏-和癌症疾病的检测,免疫应答的检测。该方法可以用于活性物质开发、细胞外囊泡的直接和绝对定量中、伴随治疗的诊断(靶向分析(target engagement))、分化诊断、蛋白质-蛋白质-相互作用的检测中和/或细胞外囊泡的分型中。

[0098] 本发明的另一主题是根据本发明的方法在监测利用细胞外囊泡进行的治疗中以及在监测和/或检验活性物质和/或治疗方法的效果中的用途。因此,所述方法可以在临床测试、研究中以及在治疗监测中使用。为此,按照根据本发明的方法测量样品并比较结果。

[0099] 本发明的另一主题是实施根据本发明的方法以确定活性物质对患病细胞的效果。在此,借助于样品中细胞外囊泡的表征将结果相互比较。样品相应地是在给予活性物质或实施治疗方法之前或之后或在不同时间点提取的体液。根据本发明,将结果与没有经受活性成分和/或治疗方法的对照进行比较。借助于结果选择活性成分和/或治疗方法。

[0100] 本发明的另一主题是实施根据本发明的方法以确定在临床研究中是否接受人。为此,按照根据本发明的方法测量样品并基于极限值做出决定。

[0101] 下面借助于附图和作为有利的实施例的所属的测量详细阐述本发明。

[0102] 图1示出了在对两个样品取平均值(重复测量,50幅图像)并应用强度滤波器(16384个强度值中的4000个)之后对显微术图像进行定量评估的结果。A)示出了在705 nm处的发射(EM)和在633 nm处的激发(EX)。该通道表示APC染料。B)示出了在Ex/Em=561/600 nm时检测到的像点(像素)。该通道激发PE和mCherry染料和C)用于Ex/Em=488/600。该通道激发PE染料。样品1是HEK细胞的细胞培养上清液,其不表达NEF-mCherry并用具有PE染料的抗-MHC1抗体处理过。样品2对应于样品1,区别在于,MHC1抗体带有APC染料。样品3中存在HEK细胞的细胞培养上清液,HEK细胞表达NEF-mCherry融合蛋白并用抗MHC1-抗体-PE标记过。样品4对应于样品3,区别在于,用APC替代PE来标记抗-MHC1抗体。在样品5中,NEF-mCherry表达细胞的细胞培养上清液没有用抗体来标记。在A)中可以看出,样品1和3与其它样品明显不同。用带有APC染料的抗-MHC1抗体处理这些样品。因此,可以在这些样品中检测带有MHC1蛋白的细胞外囊泡。在B)中可以看出,样品1具有比其余样品更少的像素数。在该荧光通道中,PE染料和mCherry被激发,因此没有APC。在该图中可以看出,可以定量表达在细胞中并且包装在细胞外囊泡中的PE (样品2)和mCherry (样品5)。组合(样品3和4)也提供适合于定量的信号。

[0103] C)示出与A)相反的图像,并允许用PE染料单独定量抗-MHC1-抗体。因此,也可以用这些抗体测量细胞外囊泡。

[0104] 将NEF理解为是指可在外泌体中找到的负调节因子,一种蛋白质。将mCherry理解为是指一种在558 nm处具有最大吸收并且在583 nm处具有最大发射的荧光蛋白。

[0105] 测定的建立:

对于该实验,使用具有384个反应室(RK)和玻璃底部的商用微量滴定板(Greiner Bio-one; Sensoplate Plus)。首先,建立微量滴定板的表面。为此,将板放置在干燥器中,其中一个具有5%的APTES的甲苯皿位于其中。将干燥器充满氩气并孵育1小时。然后,将皿移除,

并将板在真空中干燥2小时。向干燥的板的RK中注入20μl的SC-PEG-CM (MW 3400; Laysan Bio)在去离子H_2O中的2 mM溶液，并孵育4小时。孵育后，用水洗涤RK三次，然后用每种20μL的200 mM EDC水溶液(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺;Sigma)和用50 mM NHS(N-羟基琥珀酰亚胺;Sigma)孵育30分钟。将该板再次用去离子水洗涤三次。然后，RK用作为捕获剂分子的抗-CD63抗体和抗-MHCI抗体涂覆(20μl，在PBS中每种抗体5 μg ml^{-1}，1小时)。随后，用洗涤程序用具有0.1% Tween-20和TBS的TBS处理RK，所述洗涤程序由各三次洗涤和空抽吸(Leersaugen)组成。在下一步骤中，将RK用50μl Smartblock (Candor Bioscience GmbH)涂覆，在室温(RT)下过夜，并且在该时间到期之后再次用盐水三-(羟甲基)-氨基甲烷(TBS;pH＝7.4)洗涤三次。然后，以一式三份的实施方案(in dreifacher Ausführung)，将每20μl样品施加在RK中并且在室温下孵育1小时。在孵育后，将RK用TBS洗涤三次并掺入20μl检测抗体。作为检测抗体，使用抗-MHC1-抗体，其预先用荧光染料PE (Phycoeritrin)或用APC (Allophycocyanin)标记。检测抗体在TBS中一起稀释至每种抗体的最终浓度为1.25 ng ml^{-1}。给每个RK施加20μl的抗体溶液，并在室温下孵育1小时。在该时间到期之后，将板用TBS洗涤三次并用薄膜密封。

[0106] 在具有100倍油浸物镜的TIRF(全内反射荧光)显微镜(Leica)中进行测量。为此，用浸油大量涂抹微量滴定板的玻璃底部，并将该板引入到显微镜的自动载物台中。然后，每个RK在两个荧光通道(Ex/Em＝633/715 nm，561/600 nm和488/600 nm)中的5 x 5位置相继地拍摄一张图像。选择最大激光功率(100%)、500 ms的曝光时间和800的增益值。然后评估图像数据。针对每个通道，将强度阈值确定在总强度的约25%灰度处。在评估步骤中，首先将强度阈值应用于每个通道中的每个图像，并且随后将两个值中的相同位置的图像相互比较。仅对每个图像的那些像素进行计数，其中在两个通道中，该像素都位于通道的强度阈值上方的完全相同的位置处。最后，对每个RK中所有图像上的像素数取平均值，然后确定复本值(Replikatwerte)的平均像素数的平均值并且给出标准偏差。

[0107] 参考文献：

[1]Thery, C., L. Zitvogel, 和S. Amigorena, *Exosomes: Composition, biogenesis and function.* Nature Reviews Immunology, 2002. 2(8): 第 569-579页.

[2]Wang, W. 和M.T. Lotze, *Good things come in small packages: exosomes, immunity and cancer.* Cancer Gene Therapy, 2014. 21(4): 第139-141页.

[3]De Toro, J., 等人, *Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications.* Frontiers in Immunology, 2015. 6.

[4]Carvalho, J.和C. Oliveira, *Extracellular Vesicles - powerful markers of cancer EVolution.* Frontiers in Immunology, 2015. 5.

[5]Boulanger, C.M.,等人, *Extracellular vesicles in coronary artery disease.* Nature Reviews Cardiology, 2017. 14(5): 第259-272页.

[6]Gamez-Valero, A.,等人, *Urinary extracellular vesciles as source of biomarkers in kidney diseases.* Frontiers in Immunology, 2015. 6.

[7]EL Andaloussi, S.,等人, *Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities.* Nature Reviews Drug Discovery, 2013. 12(5): 第348-

358页.

[8]Benito-Martin, A.,等人, *The new deal a potentia role for secretec vesicles in innate immunity and tumor progression.* Frontiers in Immunology, 2015. 6: 第1-13页.

[9]Erdbrugger, U.和J. Lannigan, *Analytical Challenges of Extracellular Vesicle Detection: A Comparison of Different Techniques.* Cytometry Part A, 2016. 89a(2): 第123-134页.

[10]Maas, S.L.N.,等人, *Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics.* Journal of Controlled Release, 2015. 200: 第87-96页.

[11]Saenz-Cuesta, M., M. Mittelbrunn,和D. Otaegui, *Editorial: Novel clinical applications of extracellular vesicles.* Frontiers in Immunology, 2015. 6: 第1-2页.

[12]Janissen, R., L. Oberbarnscheidt, 和F. Oesterhelt, *Optimized straight forward procedure for covalent surface immobilization of different biomolecules for single molecule applications.* Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2009. 71(2): 第200-207页。

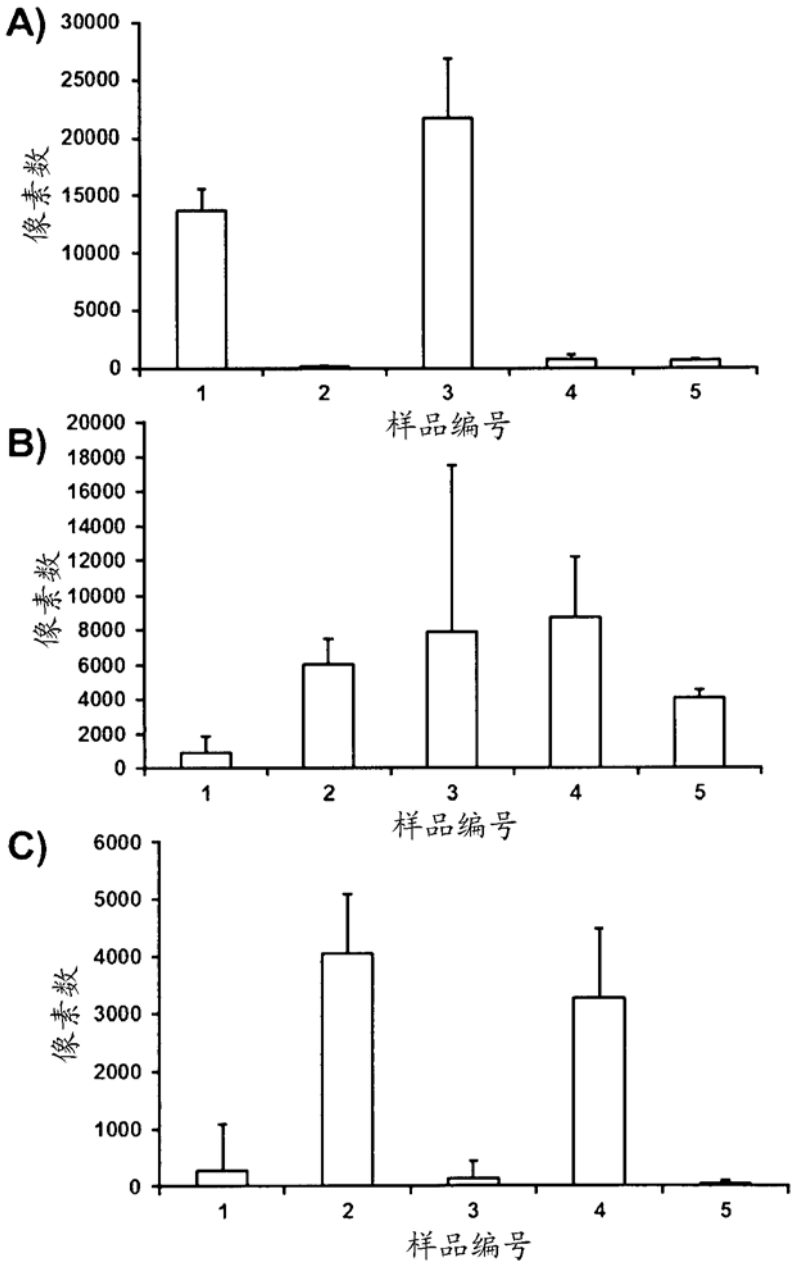

A)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
像素数
1
2
3
4
5
样品编号
B)
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
像素数
1
2
3
4
5
样品编号
C)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
像素数
1
2
3
4
5
样品编号

图 1