



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111157504 B

(45) 授权公告日 2022.06.14

(21) 申请号 202010039641.3

审查员 于丹

(22) 申请日 2020.01.14

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111157504 A

(43) 申请公布日 2020.05.15

(73) 专利权人 东南大学
地址 211102 江苏省南京市江宁区东南大
学路2号

(72) 发明人 陈宝安 马晓燕 栾成欣 吴雪
周芳 张静

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204
专利代理师 冒艳

(51) Int. Cl.
G01N 21/64 (2006.01)

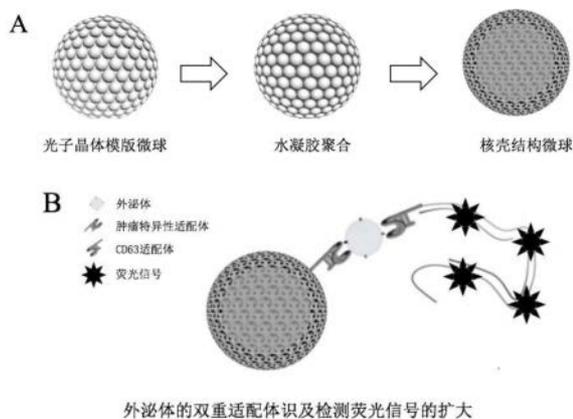
权利要求书1页 说明书3页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于光子晶体的外泌体多元检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于光子晶体的外泌体多元检测方法,基于核壳式光子晶体材料,通过在其表面修饰不同的肿瘤特异性适配体,实现对不同肿瘤来源的外泌体亚群多元检测,最终通过CD63适配体的双重识别及杂交链式反应得到放大的荧光,进而对外泌体进行检测。该方法具有稳定性好、准确、高效、节省时间、避免重复劳动等优点。



1. 一种基于光子晶体的外泌体多元检测方法,其特征在于:首先在活化后的核壳式光子晶体材料表面修饰不同的肿瘤特异性适配体,实现对不同肿瘤来源的外泌体亚群多元检测,与外泌体溶液共同孵育后,利用CD63适配体进行双重识别及杂交核酸链式反应得到放大的荧光;

所述CD63适配体有一段能够触发杂交链式反应的序列,所述序列为SEQ ID NO.1:

5' -caccacacctcgctcccgtgacactaatgctat ttt ttt aaccctaaccct-3' ;

所述的双重识别一是指肿瘤特异性适配体特异性识别肿瘤来源外泌体表面的特异性蛋白包括Epcam适配体、PSMA适配体、MUC-1适配体或AS1411适配体,一是CD63适配体识别外泌体的四跨膜蛋白之一的cd63。

2. 根据权利要求1所述的基于光子晶体的外泌体多元检测方法,其特征在于:所述核壳式光子晶体材料的制备方法,包括如下步骤:

(1) 制备光子晶体微球模板:单分散的胶体晶体纳米粒子加去离子水稀释形成胶体溶液,用微流控装置剪切成单分散的液滴,固化液滴模板,清洗,煅烧之后,即可;

(2) 制备核壳式光子晶体水凝胶微球:将光子晶体微球投入水凝胶聚合前体溶液中,固化后将水凝胶浸泡在去离子水中,根据微球内外不同的膨胀程度从水凝胶中剥离光子晶体微球,通过腐蚀得到核壳式光子晶体材料。

3. 根据权利要求2所述的基于光子晶体的外泌体多元检测方法,其特征在于:所述步骤(1)中胶体晶体纳米粒子为二氧化硅胶体粒子、二氧化钛胶体粒子或聚苯乙烯类聚合物溶液。

4. 根据权利要求2所述的基于光子晶体的外泌体多元检测方法,其特征在于:所述步骤(2)中水凝胶聚合前体溶液为聚乙二醇双丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯明胶或丙烯酸中的一种或几种的混合。

5. 根据权利要求2所述的基于光子晶体的外泌体多元检测方法,其特征在于:所述步骤(2)中腐蚀所用的腐蚀剂是氢氟酸或氢氧化钠。

6. 根据权利要求1所述的基于光子晶体的外泌体多元检测方法,其特征在于:所述杂交核酸链式反应所用的两段序列为SEQ ID NO.2:5' -actttgaaccctagggttagggtt-3' ;SEQ ID NO.3:5' -agggttcaaagtaaccctaaccct-3' ,两段序列均为FAM荧光修饰。

7. 根据权利要求1所述的基于光子晶体的外泌体多元检测方法,其特征在于:所述用MES/EDC/NHS活化系统进行活化。

一种基于光子晶体的外泌体多元检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及外泌体的检测方法,特别涉及一种基于光子晶体的外泌体多元检测方法。

背景技术

[0002] 外泌体是细胞分泌的一类膜性囊泡,大小在30-150nm之间,可由体内多种细胞分泌并稳定存在于在体液循环中。外泌体外部有磷脂双分子层保护,内部携带由来自亲本细胞的多种生物大分子,包括蛋白质、脂质和核酸分子等,携带由亲本细胞的大量信息,是细胞间通讯的重要运载体。研究证明外泌体在促进肿瘤生长与转移过程中起重要作用,在肿瘤诊断和治疗领域研究价值巨大。尤其在临床诊断领域,表达肿瘤特异性标志物的肿瘤来源外泌体亚群作为肿瘤液体活检生物标志物具有广泛应用前景。目前外泌体检测方法多耗时耗力,多依赖于昂贵的仪器,难以实现同时对多种外泌体亚群进行检测。

[0003] 光子晶体是一种特殊的纳米材料,周期性的纳米结构赋予它稳定的反射峰及结构色。其中以功能性水凝胶构建的核壳式结构因其编码稳定、及较大的比表面积、易修饰等优点,在生物检测分析方面逐渐显现出巨大的潜力。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,相较于基于抗体的免疫检测方法,适配体作为一种新型的分子识别元件,具有更多的优势:亲和力高、特异性强、制备方便、稳定性好。结合上述两者的优点,我们构建出一种外泌体多元检测的新方法。

发明内容

[0004] 发明目的:本发明目的是提供基于光子晶体的外泌体多元检测方法。

[0005] 技术方案:本发明提供一种基于光子晶体的外泌体多元检测方法,首先在活化后的核壳式光子晶体材料表面修饰不同的肿瘤特异性适配体,实现对不同肿瘤来源的外泌体亚群多元检测,与外泌体溶液共同孵育后,利用CD63适配体进行双重识别及杂交核酸链式反应得到放大的荧光。所述的双重识别一是指肿瘤特异性适配体特异性识别肿瘤来源外泌体表面的特异性蛋白比如epcam,一是CD63适配体识别外泌体的四跨膜蛋白之一的cd63。

[0006] 进一步地,所述核壳式光子晶体材料的制备方法,包括如下步骤:

[0007] (1) 制备光子晶体微球模板:单分散的胶体晶体纳米粒子加去离子水稀释形成胶体溶液,用微流控装置剪切成单分散的液滴,固化液滴模板,清洗,煅烧之后,即可;

[0008] (2) 制备核壳式光子晶体水凝胶微球:将光子晶体微球投入水凝胶聚合前体溶液中,固化后将水凝胶浸泡在去离子水中,根据微球内外不同的膨胀程度从水凝胶中剥离光子晶体微球,通过腐蚀得到核壳式光子晶体材料。

[0009] 进一步地,所述步骤(1)中胶体晶体纳米粒子为二氧化硅胶体粒子、二氧化钛胶体粒子或聚苯乙烯类聚合物溶液。

[0010] 进一步地,所述步骤(2)中水凝胶聚合前体溶液为聚乙二醇双丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯明胶或丙烯酸中的一种或几种的混合。

[0011] 进一步地,所述步骤(2)中腐蚀所用的腐蚀剂是氢氟酸或氢氧化钠。

[0012] 进一步地,所述肿瘤特异性适配体为Epcam适配体、PSMA适配体、MUC-1适配体或AS1411适配体。

[0013] 进一步地,所述CD63适配体有一段能够触发杂交链式反应的序列,所述序列为SEQ ID NO.1:

[0014] 5'-cacccacctcgctcccgtgacactaatgctat ttt ttt aaccctaaccct-3'。

[0015] 进一步地,所述杂交核酸链式反应所用的两段序列为SEQ ID NO.2:5'-actttgaaccctagggttagggtt-3';SEQ ID NO.3:5'-agggttcaaagtaaccctaaccct-3',两段序列均为FAM荧光修饰。

[0016] 进一步地,所述用MES/EDC/NHS活化系统进行活化。

[0017] 有益效果:本发明方法基于光子晶体的稳定编码,在其表面进行肿瘤特异性适配体的修饰,可同时实现对多种肿瘤来源外泌体的多元检测,稳定性好,准确、高效,操作简单,省时省力。

附图说明

[0018] 图1为基于光子晶体的外泌体多元检测方法原理示意图:图A为核壳式光子晶体微球制备过程;图B为利用适配体双重识别及核酸链式反应扩增对外泌体进行检测;

[0019] 图2为核壳式光子晶体微球的电镜表征:图a为微球的整体结构;图b为光子晶体模版的表面结构;图c为水凝胶聚合后的表面结构;图d为核壳式光子晶体微球的表面结构。

具体实施方式

[0020] 实施例1肝癌细胞系HepG2细胞上清液来源的外泌体检测

[0021] 1、光子晶体模版微球的制备:将单分散的SiO₂纳米粒子加去离子水调节浓度至20%;利用自制的玻璃微流控装置使胶体溶液在流动相中剪切成单分散的液滴,将液滴模板置于烘箱75℃干燥固化,洗去表面杂质后,置于马弗炉中800℃煅烧4h。

[0022] 2、水凝胶聚合前体溶液的配制:取700μL去离子水加入1μL光引发剂、200μL聚乙二醇双丙烯酸酯、100μL丙烯酸混匀后得水凝胶聚合前体溶液。

[0023] 3、核壳式光子晶体水凝胶微球的制备:将光子晶体模版微球投入水凝胶聚合前体溶液中约3h,置于强紫外光照下聚合10~15s,然后浸泡至去离子水溶液中,根据微球内外不同的膨胀程度从水凝胶中剥离光子晶体微球,通过4%氢氟酸腐蚀10min得到核壳式结构。

[0024] 4、肿瘤特异性适配体修饰:用MES/EDC/NHS活化系统对光子晶体微球进行活化0.5h,对其表面进行肿瘤特异性适配体修饰。其中适配体以Epcam为例,其序列为:5' NH₂-cactacagaggttgctgtcccacgttgcatggggggttgctg-3',SEQ ID NO.7,其中合成序列5'端加有氨基基团。

[0025] 5、进行肝癌细胞系HepG2细胞上清液来源的外泌体孵育与捕获。

[0026] 6、CD63适配体双重识别及核酸链式反应荧光信号的放大:利用CD63适配体对外泌体进行双重识别,所用CD63适配体后设计有一段可以触发核酸链式反应的序列SEQ ID NO.1:5'-cacccacctcgctcccgtgacactaatgctat ttt ttt aaccctaaccct-3',核酸链式反

应所用的两段序列为SEQ ID NO.2:5' -actttgaaccctagggttagggtt-3';SEQ ID NO.3:5' -agggttcaaagtaaccctaaccct-3',两段序列均为FAM荧光修饰。经过核酸链式反应后,得到放大的荧光信号。

[0027] 实施例2乳腺癌、前列腺癌、白血病多种细胞系来源外泌体的多元检测

[0028] 1、利用不同粒径的SiO₂纳米粒子组装成反射峰在682,571,and 495nm的红、绿、蓝三种不同颜色的光子晶体模版微球得到相应的核壳式结构。

[0029] 2、用MES/EDC/NHS活化系统活化0.5h后,分别对红、绿、蓝色微球表面进行肿瘤特异性适配体MUC-1,PSMAandAS1411的修饰。其序列分别为:

[0030] MUC-1:5' NH₂-gggagacaagaataaacgcgctcaagcagttgatcctttggataccctggttcgacaggaggctcacaacaggc-3',SEQ ID NO.4;

[0031] PSMA:5' NH₂-gcgttttcgcttttgcgttttgggtcatctgcttacgatagcaatgct-3',SEQ ID NO.5;

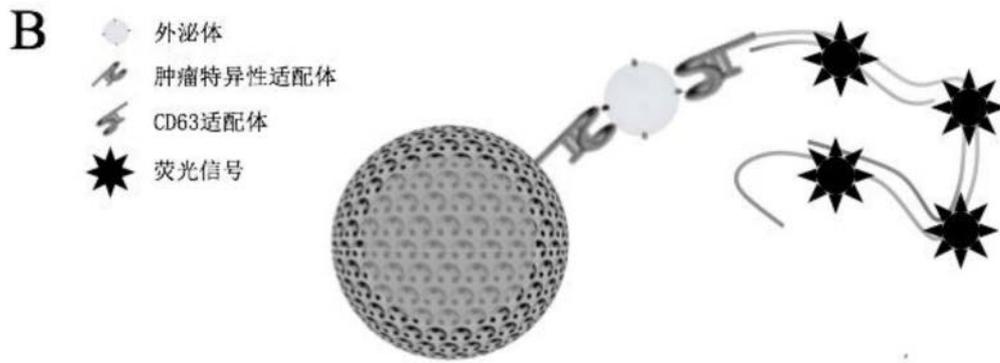
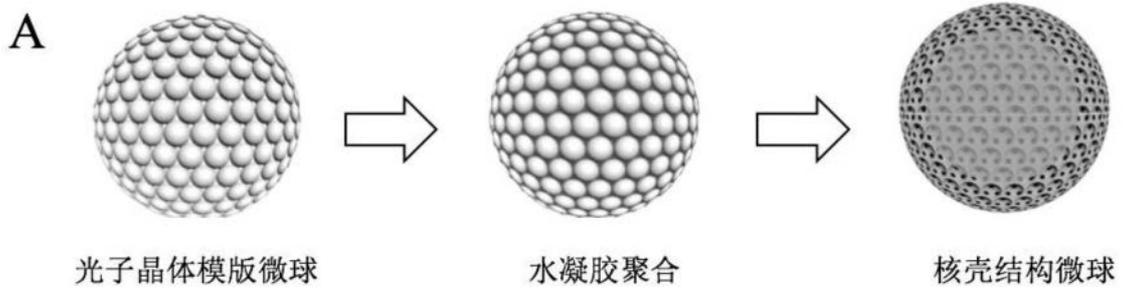
[0032] AS1411:5' NH₂-ggtggtggtggttgtggtggtggtgg-3',SEQ ID NO.6.

[0033] 3、同时对乳腺癌、前列腺癌、白血病多种细胞系上清液来源的外泌体进行孵育与捕获。

[0034] 4、CD63适配体双重识别及核酸链式反应荧光信号的放大:利用CD63适配体对外泌体进行双重识别,所用CD63适配体后设计有一段可以触发核酸链式反应的序列SEQ ID NO.1:5' -caccacacctcgctcccgtgacactaatgctatTTTTTTAACCTAACCT-3',核酸链式反应所用的两段序列为SEQ ID NO.2:5' -actttgaaccctagggttagggtt-3';SEQ ID NO.3:5' -agggttcaaagtaaccctaaccct-3',两段序列均为FAM荧光修饰。经过核酸链式反应后,得到放大的荧光信号。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 东南大学
- [0003] <120> 一种基于光子晶体的外泌体多元检测方法
- [0004] <160> 7
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 51
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] cacccacct cgctcccggtg acactaatgc tattttttta accctaacc t 51
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 24
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] actttgaacc ctagggtttag ggtt 24
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 24
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0022] <400> 3
- [0023] agggttcaaa gtaaccctaa ccct 24
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 74
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0028] <400> 4
- [0029] gggagacaag aataaacgcg ctcaagcagt tgatcctttg gataccctgg ttcgacagga 60
- [0030] ggctcacaac aggc 74
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 48
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0035] <400> 5
- [0036] gcgttttcgc ttttgcgttt tgggtcatct gcttacgata gcaatgct 48
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 26

-
- [0039] <212> DNA
[0040] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0041] <400> 6
[0042] ggtggtggtg gttgtggtgg tggtagg 26
[0043] <210> 7
[0044] <211> 48
[0045] <212> DNA
[0046] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0047] <400> 7
[0048] cactacagag gttgcgtctg tcccacgttg tcatgggggg ttggcctg 48



外泌体的双重适配体识别及检测荧光信号的扩大

图1

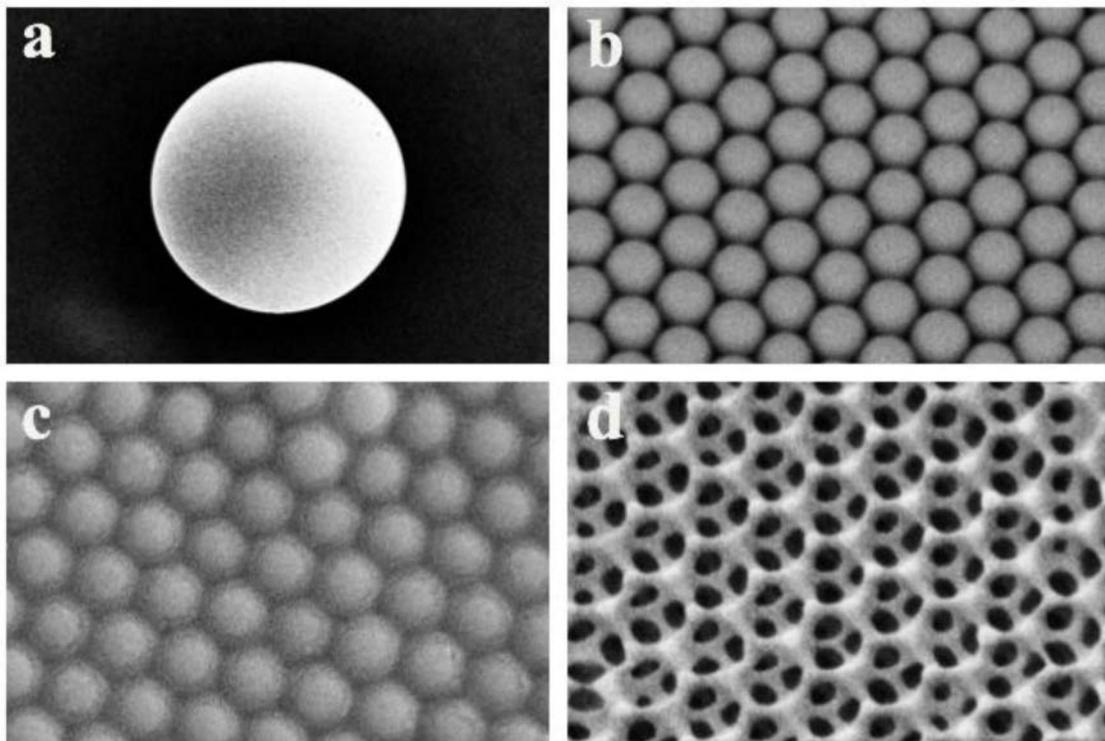


图2