(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 113614531 A
(43)申请公布日 2021.11.05

(21)申请号 202080012032.7

(22)申请日 2020.01.30

(30)优先权数据
10201900940Y 2019.01.31 SG

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.07.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2020/050764 2020.01.30

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/157705 EN 2020.08.06

(71)申请人 新加坡国立大学
地址 新加坡新加坡城
申请人 国立大学医院(新加坡)有限公司

(72)发明人 邵慧琳 Z·J·C·林 张岩
L-H·C·陈 骆子品

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 陈文平 侯宝光

(51)Int.Cl.
G01N 33/532(2006.01)
G01N 33/553(2006.01)
G01N 21/55(2014.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 25/16(2006.01)

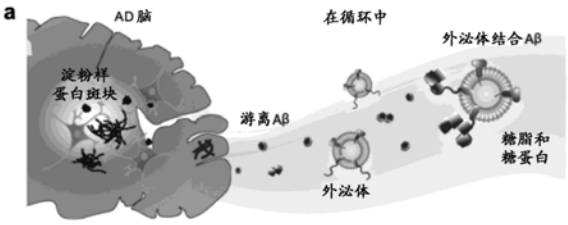
权利要求书2页 说明书30页 附图24页

(54)发明名称

检测神经变性疾病的方法

(57)摘要

本公开一般涉及神经病学领域。具体地，本公开涉及一种检测受试者中神经变性疾病的方法及其治疗方法。所述方法包括检测获自受试者的样品中外泌体结合的聚集生物标志物的水平，其中与参照相比外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明受试者患有神经变性疾病。还描述了用于检测有患淀粉样变性或神经变性疾病风险的受试者的方法、用于检测和治疗受试者的淀粉样变性或神经变性疾病的方法、以及测定样品中生物标志物聚集状态的方法。



CN 113614531 A

1.一种检测受试者的神经变性疾病或淀粉样变性的方法,所述方法包括检测获自所述受试者的样品中外泌体结合的聚集生物标志物的水平,其中与参照相比,所述外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明所述受试者患有神经变性疾病或淀粉样变性。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述生物标志物选自由Aβ、APP、α-Syn、Tau、APOE、SOD1、TDP-43、bassoon和/或纤连蛋白组成的组。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述方法包括检测所述外泌体结合的生物标志物的分子亚型的水平。

4.根据权利要求3所述的方法,其中Aβ的分子亚型是Aβ42、Aβ40、Aβ39或Aβ38。

5.根据权利要求1所述的方法,其中所述生物标志物是前原纤维聚集体。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括检测选自由CD63、CD9、CD81、ALIX、TSG101、Flotilin-1、Flotilin-2、LAMP-1、HSP70、HSP90、RNA和DNA组成的组的外泌体生物标志物,其中所述外泌体生物标志物与所述外泌体结合的生物标志物共定位。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括检测选自由NCAM、L1CAM、CHL-1和IRS-1组成的组的神经元生物标志物,其中所述神经元生物标志物与所述外泌体结合的生物标志物共定位。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述神经变性疾病选自阿尔茨海默病、轻度认知障碍、痴呆、血管性痴呆、血管性轻度认知障碍、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症、多发性硬化症、进行性核上性麻痹和/或Tau蛋白病。

9.根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述神经变性疾病选自阿尔茨海默病和轻度认知障碍。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述方法包括治疗所述患有神经变性疾病或淀粉样变性的受试者。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述样品是组织活检样品、血液、血浆、血清或脑脊液。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述方法进一步与脑成像研究相关联。

13.一种检测有患神经变性疾病或淀粉样变性风险的受试者的方法,所述方法包括检测获自所述受试者的样品中外泌体结合的聚集生物标志物的水平,其中与参照相比,所述外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明所述受试者患有神经变性疾病或淀粉样变性。

14.一种检测和治疗受试者的神经变性疾病或淀粉样变性的方法,所述方法包括:a)检测获自所述受试者的样品中外泌体结合的聚集生物标志物的水平,其中与参照相比,外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明所述受试者患有神经变性疾病或淀粉样变性;和b)治疗所述患有神经变性疾病或淀粉样变性的受试者。

15.一种确定样品中生物标志物的聚集状态的方法,所述方法包括检测所述样品中外泌体结合的生物标志物的水平,其中与参照相比,外泌体结合的生物标志物的水平增加表明所述生物标志物的聚集程度。

16.根据权利要求15所述的方法,其中所述方法包括在检测外泌体结合的生物标志物

水平的步骤之前使所述样品与外泌体群接触的步骤。

17.根据权利要求15或16所述的方法，其中与非聚集生物标志物相比，所述样品中的所述聚集生物标志物优先结合外泌体。

18.根据权利要求17所述的方法，其中所述样品是从受试者获得的。

19.根据权利要求18所述的方法，其中与参照相比，所述生物标志物的聚集程度增加表明所述受试者中的神经变性疾病或淀粉样变性。

20.根据权利要求19所述的方法，其中所述方法包括治疗所述患有神经变性疾病或淀粉样变性的受试者。

21.根据权利要求20所述的方法，其中所述治疗包括向所述受试者施用治疗有效量的一种或多种药物或它们的组合。

22.根据权利要求21所述的方法，所述药物选自胆碱酯酶抑制剂、NMDA受体拮抗剂、胆碱酯酶抑制剂与NMDA受体拮抗剂的组合、BACE1抑制剂、抗体、蛋白质聚集抑制剂、蛋白酶体抑制剂、小分子、基因疗法、抗tau药物或它们的组合。

检测神经变性疾病的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年1月31日提交的标题为“检测神经变性疾病的方法”的新加坡第10201900940Y号临时申请的优先权。

技术领域

[0003] 本公开一般涉及神经病学领域。具体地，本公开涉及检测个体中淀粉样变性或神经变性疾病的方法以及监测和治疗个体的方法。

背景技术

[0004] 表面等离子体共振(SPR)传感是一种在实验室中广泛使用的技术，用于表征生物分子之间的相互作用，例如抗体-抗原之间的相互作用。该技术通常基于将配体捕获分子固定在金属表面上并测量配体与捕获分子结合时的折射率变化。该技术是一种无标记技术，不需要使用专门的标签或染料来敏感地测量分子之间的相互作用。目前正在开发用于实验室诊断患有不同疾病的患者，如痴呆症、肝炎、糖尿病和癌症。

[0005] 痴呆症是21世纪的公共健康危机。阿尔茨海默病(AD)是最常见的严重痴呆症，其特征是记忆力和认知功能逐渐丧失。感染的个体在自我照顾、社交和职业功能方面表现出明显的局限性。然而，早在这些全面的临床症状出现之前，AD分子特征可能就会显现和发展。这些包括细胞外淀粉样蛋白β(Aβ)斑块和细胞内tau神经原纤维缠结。由于复杂且渐进的神经病理学，早期检测和干预被认为是疾病修饰疗法成功的关键。

[0006] 然而，目前的AD诊断和疾病监测是主观的和后期的。它们是通过使用已发布标准的临床和神经心理学评估来实现的。这些方法缺乏敏感性和特异性，特别是在早期阶段，症状很微妙并且与各种其他疾病显著重叠。正在开发新的分子诊断分析，包括通过正电子发射断层扫描(PET)进行脑脊液测量和脑淀粉样斑块成像；然而，这些测试面临局限性，因为它们要么需要侵入性腰椎穿刺，要么对于更广泛的临床采用来说过于昂贵。因此，人们对寻找AD的血清学生物标志物以协助早期诊断和疾病监测有着浓厚的兴趣。

[0007] 因此，需要克服或至少减轻上述问题中的一个或多个。

发明内容

[0008] 本文公开了一种检测个体中淀粉样变性或神经变性疾病的方法以及监测和治疗个体的方法。

[0009] 在一个方面，提供了一种检测个体中淀粉样变性或神经变性疾病的方法，该方法包括检测获自个体的样品中外泌体结合的聚集生物标志物的水平，其中与参照相比外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明个体患有神经变性疾病。

[0010] 在一个方面，提供了一种检测个体发生淀粉样变性或神经变性疾病风险的方法，该方法包括检测获自个体的样品中与外泌体结合的聚集生物标志物的水平，其中与参照相比外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明个体患有神经变性疾病。

[0011] 在一个方面，提供了一种检测和治疗个体的淀粉样变性或神经变性疾病的方法，该方法包括：

[0012] a)检测获自个体的样品中外泌体结合的聚集生物标志物的水平，其中与参照相比外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明个体患有神经变性疾病；

[0013] b)治疗患有神经变性疾病的个体。

[0014] 在一个方面，提供了一种测定样品中生物标志物聚集状态的方法，该方法包括检测样品中外泌体结合的生物标志物的水平，其中与参照相比外泌体结合的生物标志物的水平增加表明生物标志物的聚集程度。

附图说明

[0015] 现在将参照附图仅通过非限制性示例的方式描述本发明的一些实施方案，其中：

[0016] 图1：用于分析循环外泌体结合Aβ的APEX平台

[0017] (a)外泌体与Aβ蛋白结合。在AD脑病理学中发现的淀粉样斑块的主要成分Aβ蛋白被释放到细胞外空间。外泌体是哺乳动物细胞主动分泌的纳米级细胞外膜囊泡。通过其表面糖蛋白和糖脂，外泌体可以与释放的Aβ蛋白结合。(b)外泌体结合的Aβ的透射电子显微照片。来自神经元细胞(SH-SY5Y)的外泌体用Aβ42聚集体处理，并通过Aβ42-特异性抗体用金纳米颗粒(10nm)标记。纳米颗粒显示为块点(由红色箭头指示)。(c)APEX测定示意图。为了在纳米尺度上进行灵敏的分析，外泌体首先被免疫捕获到等离子体纳米传感器上(在放大之前)。通过原位酶促放大，在传感器结合的外泌体上局部形成不溶性光学沉积物(放大后)。这种沉积在空间上被定义为分子共定位分析，并改变了SPR信号增强的折射率。请注意，为了补充酶促放大，纳米传感器被背光(远离酶活性)以实现分析稳定性。沉积导致通过纳米传感器的透射光产生红移。(d)具有APEX放大的透射光谱变化的代表性示意图。特异性外泌体结合(之前)和随后的放大分析(之后)通过APEX平台监测为透射光谱位移(Δλ)，a.u.任意单位。(e)使用APEX平台在患有以下疾病的患者的血样中测量外泌体结合的Aβ，疾病例如阿尔茨海默病(AD)、轻度认知障碍(MCI)和无认知障碍(NCI)的对照组。血液测量与脑淀粉样斑块沉积的相应PET成像相关。(f)APEX微阵列的照片。每个传感器芯片包含6×10个传感元件，由均匀制造的等离子体晶格组成，用于多重测量。有关传感器制造、表征和设计优化的信息，请分别参见图7-10。

[0018] 图2：APEX信号放大和多重分析

[0019] (a)逐步的APEX透射光谱变化。我们进行了一系列操作，即抗体偶联(抗CD63)到传感器上、外泌体结合、酶标记和酶促沉积，并监测由此产生的光谱偏移。虽然酶标记没有引起任何显著变化，但沉积物的形成导致(****P＜0.0001，n.s.非显著性，学生t检验)。(b)APEX信号放大和光学沉积面积覆盖的比较。通过扫描电子显微镜(SEM)分析(****p＜0.0001，学生t检验)测定面积覆盖率的增加。所有数据均归一化为信号放大前的数据。插入物(右)显示了APEX放大前后传感器结合的外泌体的SEM图像。(c)带背光的有限差分时域模拟。APEX传感器设计，但不是镀金玻璃设计，能够通过背光产生增强的电磁场。背光照明可最大限度地减少酶活性(发生在传感器顶部)上的直接入射光。箭头表示入射光的方向。(d)APEX放大动力学的实时传感图。不同浓度的光学底物(3,3′-二氨基联苯胺四盐酸盐；高：1mg/ml，低：0.01mg/ml)用于监测放大效率。所有数据均针对阴性对照进行归一化，使用IgG

同位素对照抗体进行。(e)APEX、ELISA和Western印迹的检测灵敏度比较。放大前后的APEX检测限(虚线)通过滴定已知量的外泌体并测量它们的CD63信号来确定。(f)用于测量靶蛋白的APEX测定的特异性。为淀粉样蛋白β(Aβ42)、淀粉样蛋白前体蛋白(APP)、α-突触核蛋白(α-syn)、LI的密切同源物(CHL1)、胰岛素受体底物1(IRS-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)和tau蛋白开发了检测方法。所有测定都证明了特异性检测。热图信号被测定(行)归一化。所有测量均一式三份进行,数据在a、b、d和e显示为平均值±sd。

[0020] 图3:Ap聚集体和外泌体之间的优先结合

[0021] (a)Aβ蛋白聚集示意图。我们改变了聚类的程度并使用过滤方法分别制备小和大的Aβ42聚集体。(b)Aβ蛋白聚集体的表征。(左)透射电子显微照片显示了制备的Aβ42聚集体的球状形态。(右)动态光散射分析证实了不同大小的制剂的单峰尺寸分布。(c)外泌体-Aβ结合分析的示意图。Aβ42聚集体(小与大)被固定在APEX传感器上,并用等浓度的来自神经元细胞(SH-SY5Y)的外泌体处理以测定结合动力学。所有外泌体结合数据均针对固定在传感器上的相应Aβ42聚集体表面积进行归一化(详见方法)。(d)外泌体结合动力学的实时传感图。与类似大小的牛血清白蛋白(BSA)对照聚集体(见图13)相比,外泌体与Aβ42聚集体的结合性更强。重要的是,与外泌体对较小Aβ42聚集体(左)的结合亲和力相比,外泌体对较大的Aβ42聚集体(右)表现出更强的亲和力。请注意y轴上的比例差异。所有结合亲和力(KD)均由归一化外泌体结合数据并相对于BSA对照确定。KD(小)/KD(大)=5.27。(e)各种细胞外囊泡与Aβ42聚集体的不同结合。囊泡分别来自不同的细胞来源,即神经元、神经胶质细胞、内皮细胞、单核细胞、红细胞、血小板和上皮细胞,并以相等的浓度用于结合分析。使用APEX平台,我们首先测量了囊泡与Aβ42功能化传感器(直接)的直接结合。接下来,对于每个细胞来源,我们标记了用于来源特异性标志物(细胞来源特异性标志物)或泛外泌体标志物(即CD63,泛外泌体标志物)的结合囊泡,并测量了相关的APEX信号放大。所有测量均相对于IgG同位素对照抗体进行,并一式三份进行。数据在e中显示为平均值±sd。

[0022] 图4:循环外泌体结合Aβ与脑成像的临床相关性

[0023] (a)来自临床个体的代表性重建PET脑成像,显示脑淀粉样斑块负荷增加。特定脑区域的归一化摄取值比率SUVR,相对于平均小脑灰质强度归一化,以确定脑淀粉样斑块负荷。(b)不同循环Aβ42人群与整体平均PET脑成像的相关性(n=72)。使用APEX分析,我们测量了阿尔茨海默病(AD)患者、轻度认知障碍(MCI)患者以及无认知障碍(NCI)对照个体、血管性痴呆(VaD)患者和血管性轻度认知障碍(VMCI)患者的血样中外泌体结合的Aβ42(左)、未结合的Aβ42(中)以及总Aβ42(右)的各自的信号。当与脑淀粉样蛋白斑块的整体成像数据相关时,与未结合的Aβ42群(中心,R^2=0.0193)或总Aβ42(右,R^2=0.1471)相比,外泌体结合的Aβ42(左,R^2=0.9002)测量显示出最佳相关性。(c)不同的循环Aβ42群在区分不同的临床组(n=84)的分析。只有循环外泌体结合的Aβ42(左)的APEX测量值才能区分AD临床组(AD和MCI)以及其他正常(NCI)和临床对照(VaD、VMCI和急性中风)。未结合的Aβ42测量值(中心)和总Aβ42测量值(右)在不同临床组之间均未显示任何统计显著性(**P<0.01,****P<0.0001,n.s.,不显著,学生t检验)。所有测量均相对于IgG同种型对照抗体进行,一式三份进行。数据在b-c中显示为平均值±sd。

[0024] 图5:神经元细胞脱落的细胞外囊泡的表征。

[0025] (a)神经元细胞(SH-SY5Y)的扫描电子显微照片,显示纳米级细胞外囊泡从细胞中

大量释放。(b)释放囊泡的高倍放大图像。(c)由纳米颗粒跟踪分析测定的细胞外囊泡的单峰尺寸分布显示平均直径为～150nm。(d)囊泡裂解物的蛋白质印迹分析。对囊泡进行裂解和免疫印迹以获得外泌体标志物(LAMP1、ALIX、HSP90、HSP70、CD63、Flotillin1、TSG101)、神经元标志物(NCAM)以及包括脂蛋白(APOE)的阴性标志物和其他膜室标志物(钙连接蛋白,GRP94)。(e)用不同大小的金纳米颗粒(CD63,20nm;Aβ42,5nm)进行双重免疫标记的透射电子显微照片证实了两种标志物在同一囊泡上的共定位,表明存在外泌体结合的Aβ。

[0026] 图6:APEX放大产物

[0027] APEX传感器的扫描电子显微照片(a)放大前,外泌体通过抗CD63抗体捕获到传感器上,和(b)放大后,显示来自可溶性底物(3,3′-二氨基联苯胺四盐酸盐)的不溶性光学沉积物的局部生长。产生的APEX信号放大与局部沉积物覆盖面积的增加密切相关。

[0028] 图7:APEX微阵列传感器的大规模制造。

[0029] 所有APEX传感器均在8英寸硅(Si)晶片上制造。制造步骤包括:(1)通过热氧化制备10nm二氧化硅(SiO_2)层,并通过低压化学气相沉积(LPCVD)在晶片上沉积145nm氮化硅(Si_3N_4)。(2)涂上光刻胶后,进行深紫外(DUV)光刻以定义光刻胶中的纳米孔阵列图案。该图案通过反应离子蚀刻(RLE)转移到Si_3N_4膜上。(3)移除光刻胶后,使用等离子体增强化学气相沉积(PECVD)在晶片的正面沉积一层薄薄的SiO_2保护层(100nm)。为了使光能传输,晶片的背面旋涂了光刻胶;使用光刻方法来定义感测区域。(4)通过用RLE蚀刻,然后用Si的氢氧化钾(KOH)和四甲基氢氧化铵(TMAH)蚀刻蚀刻Si_3N_4和SiO_2。(5)蚀刻后,使用稀释的氟化氢(DHF)(1:100)移除保护性SiO_2层。(6)将Ti/Au(10nm/100nm)沉积在Si_3N_4膜上。

[0030] 图8:APEX微阵列传感器的表征。

[0031] (a)8英寸晶片的照片显示了APEX微阵列传感器芯片的大规模制造。每个晶片由＞2000个传感元件组成。(b)APEX传感器中高度均匀的纳米孔的扫描电子显微照片。插入显示了纳米孔晶格的放大视图。

[0032] 图9:逐步的光谱变化。

[0033] APEX传感器与(a)用于外泌体捕获的抗CD63抗体或(b)同位素对照抗体偶联。在APEX放大之前,所有传感器都用来自神经元细胞系(SH-SY5Y)的等浓度外泌体处理。虽然传感器显示出与抗体相似程度的表面功能化(抗体偶联),但只有抗CD63功能化的传感器显示出分别与外泌体结合和APEX放大相关的显著光谱偏移。请注意,在对照传感器中,在没有外泌体结合的情况下,APEX放大引起可忽略不计的光谱变化,a.u.任意单位。

[0034] 图10:APEX传感器性能的优化。

[0035] (a)传感器性能与背光的比较。我们比较了具有不同纳米孔直径的不同APEX传感器的SPR传输强度、光谱峰的半峰全宽(FWHM)和检测灵敏度。所有传感器都从背面照射以补充APEX酶促放大。优化的APEX设计的纳米孔直径为230nm,在悬浮在氮化硅膜上的100nm厚的金层中以450nm的规则周期性图案化。这种双层等离子体结构通过背照式支持SPR激发。(b)优化传感器的透射光谱变化对增加的折射率。折射率的增加引起透射光谱的变化,并将共振峰移动到更长的波长。(c)光谱偏移显示出与折射率增加的线性相关。(d)APEX再现性和可重复性。APEX酶促放大在同一样品上进行,并在不同用户、传感器芯片和测量时间之间进行测量。测量结果显示以下分析变异系数:组间＝2.76％,组内＝4.14％,总计＝4.59％。所有测量均一式三份或更多份进行,数据在(a)中显示为平均值±sd,a.u.任意单位,n.s.,

不显著的,学生t检验。

[0036] 图11:APEX工作流程和放大效率。

[0037] (a)用于检测蛋白质(囊外和囊内)和miRNA的APEX工作流程。(b)用于不同分子靶点的APEX放大效率。获得了以下靶点的APEX信号:囊泡外蛋白、Aβ42蛋白;囊泡内蛋白,热休克蛋白90;miRNA,miRNA-9。将所有信号归一化为添加光学底物之前的信号,以确定放大率。测量一式三份进行,数据在(b)中显示为平均值±sd。

[0038] 图12:由大Aβ聚集体组装而成的纤维状结构。

[0039] 在制备的大Aβ42聚集体孵育2小时后观察到淀粉样原纤维。形成的结构通过抗Aβ42抗体用金纳米微粒(15nm)进行免疫标记,并用透射电子显微镜进行表征。

[0040] 图13:BSA对照聚集体的制备。

[0041] (a)BSA蛋白聚集体的示意图。我们改变了加热的持续时间以分别制备小的和大的BSA对照聚集体。(b)BSA蛋白聚集体的表征。BSA聚集体的流体动力学直径通过动态光散射分析测定。两种聚集体均显示单峰尺寸分布。小聚集体的直径为～15nm,大聚集体的直径为～100nm。

[0042] 图14:从各种细胞来源分离的细胞外囊泡。

[0043] 细胞外囊泡分别获自(a)神经元(SH-SY5Y)、(b)神经胶质细胞(GLI36)、(c)内皮细胞(HUVEC)、(d)单核细胞(THP-1)、(e)红细胞、(f)血小板、(g)前列腺起源的上皮细胞(PC-3)和(h)卵巢起源的上皮细胞(SK-OV-3)。所有囊泡均采用纳米颗粒追踪分析进行表征。

[0044] 图15:不同的循环Aβ群的APEX测量。

[0045] (a)用于表征临床血浆样品中不同循环Aβ群的APEX测定配置。从天然血浆中测量外泌体结合的Aβ42和总Aβ42群,而从血浆滤液中检测到未结合的Aβ42群。(b)用外泌体结合的Aβ42孵育纤连蛋白导致APEX信号的变化可忽略不计。(c)阴性对照(APOE脂蛋白与Aβ42蛋白、人血清白蛋白/HSA)显示的信号可以忽略不计,表明APEX测定对外泌体结合的Aβ42具有特异性。所有测量均一式三份进行,数据显示为平均值±sd。

[0046] 图16:临床样品中Aβ群的表征。

[0047] (a)外泌体结合的Aβ42群。我们直接从天然血浆样品中富集了Aβ42,并测量了捕获的Aβ42中外泌体标志物(CD63、CD81和CD9)和神经元标志物(NCAM、L1CAM和CHL-1)的共定位信号的相对水平。可以检测到所有标志物,CD63是测试的临床样品中表达最高的标志物。(b)用于表征未结合的Aβ42群的血浆滤液。为了评估未结合的Aβ42群,我们使用了膜过滤(截断尺寸＝50nm,Nucleopore,Whatman)制备无囊泡血浆滤液。滤液显示出可忽略不计的囊泡计数,如通过纳米颗粒跟踪分析确定的。(c)血浆滤液也显示出可忽略不计的外泌体标志物(CD63)和神经元标志物(NCAM)的信号,证明通过过滤有效移除了外泌体。阿尔茨海默病(AD)、轻度认知障碍(MCI)和无认知障碍(NCI)的健康对照。所有测量均一式三份进行,数据显示为平均值±sd。

[0048] 图17:外泌体结合的Aβ42与区域脑淀粉样蛋白负荷的相关性。

[0049] 我们确定了特定脑区的成像SUVR,即早期受AD影响的扣带回区和晚期受AD影响的枕骨区。外泌体结合的Aβ42的APEX测量与早期受AD影响区域的成像数据(a,R^2＝0.8808)相比晚期受AD影响区域的成像数据(b,R＝0.6863)显示出更好的一致性。阿尔茨海默病(AD,n＝17),轻度认知障碍(MCI,n＝18),血管性痴呆(VaD,n＝9),血管性轻度认知障碍(VMCI,n

＝12)，无认知障碍的健康对照(NCI，n＝16)。所有测量均一式三份进行，数据显示为平均值±sd。

[0050] 图18：不同诊断的临床个体中的PET成像比较。

[0051] 在具有不同临床诊断(n＝72)的患者中进行了脑淀粉样蛋白斑块负荷的PET成像：AD(n＝17)、MCI(n＝18)、NCI(n＝16)、VaD(n＝9)和VMCI(n＝12)。整体平均斑块沉积的归一化摄取值比(SUVR)可以区分AD临床组(AD和MCI)以及其他健康个体(NCI)和临床对照(VaD和VMCI)(**P＜0.01，****P＜0.0001，学生t检验)。

[0052] 图19：临床样品中的细胞外囊泡。

[0053] (a)细胞外囊泡的代表性分析，通过纳米微粒追踪分析测量，来自不同临床诊断的个体的血样(AD＝17，MCI＝18，NCI＝16，VaD＝9，VMCI＝12，急性中风＝12)。来自临床血样的(b)囊泡大小和(c)囊泡浓度的比较(n＝84)。请注意，在不同临床诊断的样品中，囊泡大小和浓度均未发现显著差异(n.s.，不显著的，学生t检验)。

[0054] 图20：APEX检测技术、传感器设计和制造的比较。

[0055] 图21显示(a)淀粉样蛋白聚集的抑制。(b)动态光散射分析证实了单峰尺寸分布和当淀粉样蛋白在有和没有抑制剂的情况下孵育时的大小差异。(c)外泌体结合动力学的实时传感图。与较小的Aβ42聚集体(用抑制剂处理)相比，外泌体对较大的Aβ42聚集体(未处理)表现出更强的亲和力。

[0056] 图22显示了外泌体结合动力学的实时传感图。与类似大小的牛血清白蛋白(BSA)对照聚集体相比，外泌体与淀粉样蛋白(例如Aβ、APP、a-Syn、IRS-1、Tau、APOE、SOD1、TDP-43、bassoon、纤连蛋白)的结合更强。

[0057] 图23显示了用于测量靶标miRNA分子的APEX测定的特异性。开发了对miR-9、miR-15b、miR-29b、miR-29c、miR-107、miR-146a和miR-181c的测定。所有测定都证明了特异性检测。热图信号被测定(行)归一化。

具体实施方式

[0058] 本文公开了一种检测神经变性疾病的方法及其治疗方法。

[0059] 在一个方面，提供了一种传感器芯片，其包括在膜支撑层上的导电层，其中多个孔延伸穿过导电层和膜支撑层并且被布置成使得对导电层和/或膜支撑层的照明产生表面等离子体共振。

[0060] 在一个实施方案中，多层结构化材料(导电金属和支撑衬底)的设计能够实现等离子体耦合。这种设计可支持表面等离子体共振的双向激发，其中来自双向照明(从顶部或从底部)的SPR性能具有可比性。

[0061] 如本文所用，术语“导电层”可以是当被电磁能例如光波激发时表现出表面等离子体共振的导电材料。导电材料可以指例如金属导电材料。这种金属导电材料可以是任何金属，包括贵金属、碱金属、过渡金属和合金。导电材料的例子包括但不限于金、铑、钯、银、铂、锇、铱、钛、铝、铜、锂、钠、钾、镍、金属合金、氧化铟锡、氧化铝锌、氧化镓锌、氮化钛和石墨烯。在一个实施方案中，导电材料为金、银、铝、钠、铟或钛。金属可以是其裸露的形式或涂有额外的保护和增强材料的层。

[0062] 当导电材料在包括大约100nm(nm)至3000nm的波长的光学区域(紫外-可见-红外

光谱)中表现出显著的散射强度时,导电材料可以是“光学可观察的”。当导电材料在大约380nm至750nm的波长带(即可见光谱)中表现出显著的散射强度时,导电材料可以是“肉眼可见的”。

[0063] 在一个实施方案中,膜支撑层是结构化膜支撑层。

[0064] 在一个实施方案中,膜支撑层是氮化硅或二氧化钠。其他支撑材料包括可以图案化以形成耦合多层等离子体结构的衬底。

[0065] 可以改变延伸穿过导电层和膜支撑层的多个孔的直径和周期性,以实现不同的共振波长和渐逝波的穿透。

[0066] 多个孔包括对称圆孔、空间各向异性形状,例如椭圆形、狭缝,并且还包括三角形、正方形、矩形或多边形形状的任何孔。也可以使用不同形状孔的组合。孔可以具有约1500nm或更小、约1400nm或更小、约1300nm或更小、约1200nm或更小、约1100nm或更小、约1000nm或更小、约900nm或更小、约800nm或更小、约700nm或更小、约600nm或更小、约500nm或更小、约450nm或更小、约400nm或更小、约350nm或更小、约300nm或更小、约250nm或更小、约240nm或更小、约230nm或更小、约220nm或更小、约210nm或更小、约200nm或更小、约190nm或更小、约180nm或更小、约170nm或更小小于、约160nm或更小、约150nm或更小、约140nm或更小、约130nm或更小、约120nm或更小、约110nm或更小、约100nm或更小、约90nm或更小,约80nm或更小、约70nm或更小、约60nm或更小、约50nm或更小、约40nm或更小、约30nm或更小、约20nm或更小、或约10nm或更小的尺寸或直径。

[0067] 在一个实施方案中,孔可具有约150nm至约450nm的尺寸或直径。在一个实施方案中,孔的尺寸或直径选自150nm、160nm、170nm、180nm、190nm、200nm、210nm、220nm、230nm、240nm、250nm、260nm、270nm、280nm、290nm、300nm、310nm、320nm、330nm、340nm、350nm、360nm、370nm、380nm、390nm、400nm、4200nm、430nm、440nm、450nm或介于任何两者之间。在一个实施方案中,孔是小孔并且具有230nm的直径。

[0068] 术语“周期性”可以指通过孔在传感器芯片上的定位以规则的间隔重现或重复。因此,术语“周期性的”是指相对于彼此的孔的规律的预定义图案。

[0069] 表面等离子体共振传感器芯片可以包括孔的周期性阵列。规则的周期性可以允许对共振波长和渐逝波的穿透进行严格控制。在一个实施方案中,孔具有约250nm至约650nm的周期性。在一个实施方案中,孔具有选自250nm、260nm、270nm、280nm、290nm、300nm、310nm、320nm、330nm、340nm、350nm、360nm、370nm、380nm、390nm、400nm、410nm、420nm、430nm、440nm、450nm、460nm、470nm、480nm、490nm、500nm、510nm、5300nmnm、540nm、550nm、560nm、570nm、580nm、590nm、600nm、610nm、620nm、630nm、640nm和650nm或介于两者之间的周期性。在一个实施方案中,孔具有450nm的周期性。

[0070] 在一个实施方案中,孔被布置成使得在照射时产生的表面等离子体共振的衰变长度大约等于第一识别分子的靶标的直径。

[0071] 在一个实施方案中,导电层和膜支撑层设置在衬底上,该衬底在与多个孔相邻的区域中具有形成于其中的空隙,以使得能够在任一方向照射导电层和/或膜支撑层产生表面等离子体共振。

[0072] 在一个实施方案中,传感器芯片包括固定在导电层表面上的第一识别分子。可以使用本领域公知的技术将第一识别分子固定在表面上。例如,第一识别分子可以被吸附到

表面上。或者,可以在固定第一识别分子之前用一层链霉亲和素或抗生物素蛋白包被表面。第一识别分子可以通过链霉亲和素-生物素缀合被生物素化并固定在表面上。在一个实施方案中,表面可以与聚乙二醇(PEG)分子一起温育。表面可以与活性(羧化)硫醇-PEG一起温育。然后表面可以通过溶解在MES缓冲液中的过量NHS/EDC混合物中的碳二亚胺交联来活化,并与第一识别分子缀合。在替代实施方案中,表面可以与含有长活性(羧化)硫醇-PEG和短非活性甲基化硫醇-PEG的聚乙二醇(PEG)的混合物一起温育。可以优化长活性(羧化)硫醇-PEG与短非活性甲基化硫醇-PEG的比率,以实现最大的功能结合。然后表面可以通过溶解在MES缓冲液中的过量NHS/EDC混合物中的碳二亚胺交联来活化,并与第一识别分子缀合。

[0073] 术语“识别分子”可以指能够与分析物特异性结合的分子。“识别分子”可以是抗体、核酸、肽、适体、小分子或其他合成试剂。

[0074] 术语“分析物”是指存在于要在传感器芯片上检测或测量的样品中的物质。“分析物”可包括细胞、病毒、核酸、脂质、蛋白质、肽、糖肽、纳米囊泡、微囊泡、外泌体、细胞外囊泡、糖、代谢物或其组合或组织状态。“分析物”可以是例如与外泌体结合或相关联的肽或核酸(例如miRNA)生物标志物。例如,“分析物”也可以是细胞与蛋白质或蛋白质与核酸之间的复合物。

[0075] 在一个实施方案中,第一识别分子是抗体或其片段。例如,抗体可以是例如识别泛外泌体标志物或与外泌体相关联或结合的标志物的抗体。例如,抗体可以是对CD63、CD9或CD81具有特异性的抗体,它们在外泌体中是丰富的且具有特征性。抗体还可以对细胞起源特异性标志物例如CHL1、L1CAM或NCAM具有特异性。抗体还可识别与外泌体相关联或结合的生物标志物。例如,抗体可以是识别Aβ的抗Aβ抗体,或识别与外泌体结合或相关联的APP、a-syn或Tau的抗体。

[0076] 如本文所用,术语“抗体”包括但不限于合成抗体、单克隆抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链Fv(scFv)、Fab片段、F(ab')片段、二硫键连接的Fv(sdFv)(包括双特异性sdFv)和抗独特型(抗Id)抗体以及上述任何抗体的表位结合片段。本文提供的抗体可以是单特异性的、双特异性的、三特异性的或具有更高的多特异性的。多特异性抗体可以对多肽的不同表位具有特异性,或者可以对多肽以及异源表位例如异源多肽或固体支撑材料具有特异性。

[0077] 术语“蛋白质”和“多肽”可互换使用,是指通过肽键或修饰的肽键连接的任何氨基酸聚合物(二肽或多肽)。少于约10-20个氨基酸残基的多肽通常称为“肽”。本发明的多肽可包含非肽组分,例如碳水化合物基团。碳水化合物和其他非肽取代基可以由产生多肽的细胞添加到多肽中,并且会随着细胞的类型而变化。多肽在本文中根据其氨基酸骨架结构进行定义;取代基如碳水化合物基团通常没有规定,但仍然可以存在。

[0078] 如本文所述,“核酸”可以是RNA或DNA,并且可以是单链或双链,并且可以是例如编码感兴趣的蛋白质的核酸、多核苷酸、寡核苷酸、核酸类似物例如肽-核酸(PNA)、假互补PNA(pc-PNA)、锁核酸(LNA)等。此类核酸序列包括例如但不限于编码蛋白质的核酸序列,例如充当转录阻遏物、反义分子、核酶、小的抑制性核酸序列,例如但不限于RNAi、shRNAi、siRNA、microRNAi(mRNAi)、反义寡核苷酸等。

[0079] 如本文所用,“纳米囊泡”可以指内部包括空腔的天然存在的或合成的囊泡。纳米

囊泡可包括包围内部空腔内容物的脂质双层膜。纳米囊泡可包括脂质体、外泌体、细胞外囊泡、微囊泡、凋亡囊泡(或凋亡小体)、液泡、溶酶体、转运囊泡、分泌囊泡、气囊、基质囊泡或多囊泡体。纳米囊泡可具有约1000nm或更小、约900nm或更小、约800nm或更小、约700nm或更小、约600nm或更小、约500nm或更小、约450nm或更小、约400nm或更小、约350nm或更小、约300nm或更小、约250nm或更小、约240nm或更小、约230nm或更小、约220nm或更小、约210nm或更小、约200nm或更小、约190nm或更小、约180nm或更小、约170nm或更小、约160nm或更小、约150nm或更小、约140nm或更小、约130nm或更小、约120nm或更小,约110nm或更小、约100nm或更小、约90nm或更小、约80nm或更小、约70nm或更小、约60nm或更小、约50nm或更小、约40nm或更小、约30nm或更小、约20nm或更小、或约10nm或更小的尺寸。

[0080] 外泌体是一种纳米囊泡,在本领域中也称为细胞外囊泡、微囊泡或微粒。这些囊泡由真核细胞脱落到细胞外部,或从质膜上掉落到细胞外部。这些膜囊泡大小不一,直径范围为约10nm至约5000nm。通过胞内多囊泡体的胞吐作用释放的小囊泡(直径约10至1000nm,优选30至100nm)在本领域中被称为“外泌体”。本文所述的方法和组合物同样适用于所有大小的其他囊泡。

[0081] 术语“样品”是指包含分析物或被测试分析物存在的任何样品。此类样品包括源自或含有细胞、生物体(细菌、病毒)、裂解的细胞或生物体、细胞提取物、核提取物、细胞或生物体的成分、细胞外液、细胞或生物体在体外培养的培养基、血液、血浆、血清、胃肠道分泌物、尿液、腹水、组织或肿瘤的匀浆、滑液、粪便、唾液、痰、囊液、羊水、脑脊液、腹腔液、肺灌洗液、精液、淋巴液、眼泪、胸腔积液、乳头抽吸物、母乳、皮肤外分泌物、呼吸道外分泌物、肠道外分泌物和泌尿生殖道外分泌物以及前列腺液中的样品。样品可以是病毒或细菌样品、从环境来源获得的样品,例如污水体、空气样品或土壤样品,以及食品工业样品。样品可以是生物样品,它指的是它源自或从活生物体获得的事实。生物体可以是体内的(例如整个生物体)或可以是体外的(例如在培养物中生长的细胞或器官)。“生物样品”还指来自个体的细胞或细胞群或一定量的组织或流体。大多数情况下,样品已从个体身上取出,但术语“生物样品”也可以指体内分析的细胞或组织,即未从个体身上取出。通常,“生物样品”将包含来自个体的细胞,但该术语也可以指非细胞生物材料,例如血液、唾液或尿液的非细胞部分。生物样品可以来自原发性、继发性或转移性肿瘤的切除、支气管镜活检或空心针活检,或来自胸水的细胞块。此外,细针抽吸生物样品也很有用。在一个实施方案中,生物样品是原代腹水细胞。生物样品还包括源自患者组织的外植体和原代和/或转化细胞培养物。生物样品可以通过从个体中取出细胞样品来提供,但也可以通过使用先前分离的细胞或细胞提取物(例如,由另一个人、在另一个时间和/或用于另一个目的分离)来实现。也可以使用档案组织,例如那些有治疗或结果历史的组织。生物样品包括但不限于组织活检样品、擦伤(例如颊部擦伤)、全血、血浆、血清、尿液、唾液、细胞培养物或脑脊液。通过本文所述的组合物和方法分析的样品可能已经被处理用于纯化或富集其中包含的外泌体。在一个实施方式中,样品是血液。

[0082] 在一个方面,提供了一种成像系统,其包括如本文所定义的光源、检测器和传感器芯片,其中检测器定位成检测由光源产生并透射通过传感器芯片的光。

[0083] 在一个方面,还提供了包括如本文定义的传感器芯片的试剂盒。该试剂盒还可包括对捕获的分析物或与传感器芯片表面上的捕获的分析物相关联的分析物具有特异性的

第二识别分子。该试剂盒可包含一种或多种第二识别分子，其各自对一种或多种分析物具有特异性，从而可检测一种或多种分析物。

[0084] 第二识别分子可以允许1)信号放大，2)共定位分析(例如，检测在同一囊泡中同时发现的不同靶标)，和3)基于分子和组织差异的分析物亚群的分化。

[0085] 第二识别分子可以与信号放大部分偶联，并且其中信号放大部分能够诱导形成相对于捕获的分析物具有增加的光密度的不溶性聚集体并增加所测量的表面等离子体共振信号。例如，该试剂盒可以包含作为抗体的第二识别分子(例如对Aβ42具有特异性的抗体)。第二识别分子可以与辣根过氧化物酶缀合。该试剂盒还可包含酶底物。因此，辣根过氧化物酶能够诱导形成相对于传感器芯片表面上捕获的分析物具有增加的光密度的不溶性聚集体。

[0086] 术语“信号放大分子”可以指能够诱导在传感器芯片的表面上形成不溶性聚集体并由此增加相对于捕获的分析物的光密度的分子。当第二识别分子与传感器芯片表面上的分析物结合时，这会导致传输波长(光谱位移)的更大变化或传输强度的变化，从而有助于提高传感器芯片的灵敏度。“信号放大分子”例如可以是诸如辣根过氧化物酶的酶，其与酶底物反应以在传感器芯片的表面上形成不溶性聚集体。“信号放大分子”也可以是与传感器芯片表面上的第二识别分子结合并形成聚集体的第二抗体。第二抗体可以进一步与酶、金颗粒或有助于形成更大聚集体以增加光密度的大分子偶联。

[0087] 在一个实施方案中，本发明涉及一种高度灵敏的分析平台，即放大等离子体外泌体(APEX)，用于直接从阿尔茨海默病(AD)患者的血样中检测外泌体结合的淀粉样蛋白β(Aβ)。所述分析方法可以利用透射表面等离子体共振(SPR)和光学产物的原位酶促转化来实现多重群体分析。APEX技术可以实现外泌体内容物(例如蛋白质和miRNA)的多参数原位分析。APEX平台可用于测量不同的循环Aβ群(外泌体结合的、未结合的和总的)以及循环Aβ的不同组织状态，并将这些血液测量与脑淀粉样斑块负荷的PET成像相关联。

[0088] 在一个方面，提供了一种制造传感器芯片的方法，该方法包括以下步骤：

[0089] a)提供顶膜支撑层；

[0090] b)在顶膜支撑层上沉积导电层；

[0091] c)形成延伸穿过膜支撑层的多个孔，所述孔也延伸穿过导电层并且被布置成使得对导电层和/或顶膜支撑层的照射产生表面等离子体共振。

[0092] 在一些实施方案中，该方法还包括：

[0093] 在硅衬底的上下表面涂覆顶膜支撑层和底膜支撑层；

[0094] 在顶膜支撑层上提供一层光刻胶，和

[0095] 通过深紫外光刻(DUV)在光刻胶中限定多个孔，并通过反应离子蚀刻(RIE)将多个孔的图案转移到顶膜支撑层。

[0096] 在一些实施方案中，该方法还包括以下步骤：

[0097] 移除顶膜支撑层上的光刻胶，并在顶膜支撑层的表面上涂覆二氧化硅保护层；

[0098] 在底膜支撑层上涂覆一层光刻胶；

[0099] 通过光刻在光刻胶中限定感测区域；并通过反应离子蚀刻(RIE)将感测区域的图案转移到底膜支撑层；

[0100] 将感测区域的图案转移至硅衬底；

[0101] 用稀释的氟化氢移除顶膜支撑层的表面上的保护层;以及

[0102] 在顶膜支撑层上沉积导电层。

[0103] 如本文所用,术语“感测区域”是指传感器芯片中包括多个孔的区域,这些孔被布置成使得等离子体层和/或膜支撑层的照射产生表面等离子体共振。

[0104] 如本文所用,术语“抗蚀剂”是指用于将图像或图案转移到其沉积的衬底上的薄层。可以通过光刻对抗蚀剂进行图案化以形成(亚)微米级的临时掩模,该掩模在随后的处理步骤(通常是蚀刻)中保护下方衬底的选定区域。用于制备薄层(通常是粘性溶液)的材料也包含在术语抗蚀剂中。抗蚀剂通常是聚合物或其前体和其他小分子(例如光酸产生剂)的混合物,这些小分子是为特定的光刻技术专门配制的。例如,在光刻期间使用的抗蚀剂被称为“光刻胶”。在电子束光刻过程中使用的抗蚀剂被称为“电子束抗蚀剂”。

[0105] 在一个方面,提供了一种检测样品中分析物的方法,该方法包括:

[0106] a)将分析物捕获到本文定义的传感器芯片的表面上;和

[0107] b)检测第二识别分子与传感器芯片的表面上的捕获的分析物的结合,其中第二识别分子对分析物具有特异性,其中与对照样品相比第二识别分子的结合增加表明样品中存在分析物。

[0108] 该方法可以包括检测对一种或多种分析物具有特异性的一种或多种第二识别分子(顺序地或同时地)的结合。这允许检测、定量和分析样品中的多种分析物或生物标志物的组织状态(例如,共定位)。每种分析物可以被不同组的第一识别分子和第二识别分子识别。第一识别分子和第二识别分子可以分别识别相同的分析物或不同的分析物。第一识别分子和第二识别分子的不同组合可以允许检测分析物的共定位。这可以允许同时检测多种分析物并且可以允许检测这些分子的共定位。

[0109] 在一个实施方案中,第一识别分子是识别Aβ42的抗体并且第二识别分子是识别Aβ42的另一种抗体。

[0110] 在一个实施方案中,第一识别分子是识别Aβ42的抗体,第二识别分子是识别CD63的抗体,检测Aβ42和CD63的共定位。

[0111] 第二识别分子与传感器芯片的表面上捕获的分析物的“结合”可以通过光谱位移(透射波长的变化)或固定波长处的透射强度的变化来检测。例如,在传感器芯片的表面上捕获的分析物将具有初始参照波长。在结合第二识别分子时,透射波长可移至更长的波长。

[0112] 可以将样品中的透射共振波长的变化(或光谱位移(Δλ))或固定波长处的透射强度的变化与在对照样品中观察到的变化进行比较。这可用于例如确定第二识别分子与捕获的分析物的结合是否增加。

[0113] 与对照样品相比,样品中的“第二识别分子的结合增加”可以通过比较结合第二识别分子时样品和对照样品之间的光谱位移变化或固定波长下透射强度的变化来测定。光谱位移或透射强度的变化增加可以表明第二识别分子与分析物的结合增加。

[0114] 在一个实施方案中,光谱位移或透射强度的变化增加可以指个体和对照个体之间1.2倍或更大的增加。该术语还可以指选自1.1倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍,6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、21倍、22倍、23倍、24倍、25倍、26倍、27倍、28倍、29倍、30倍、31倍、32倍、33倍、34倍、35倍、36倍、37倍、38倍、39倍、40倍、41倍、42倍、43倍、44倍、45倍、46倍、47

倍、48倍、49倍、50倍、51倍、52倍、53倍、54倍、55倍、56倍、57倍、58倍、59倍、60倍、61倍、62倍、63倍、64倍、65倍、66倍、67倍、68倍、69倍、70倍、71倍、72倍、73倍、74倍、75倍、76倍、77倍、78倍、79倍、80倍、81倍、82倍、83倍、84倍、85倍、86倍、87倍、88倍、89倍、90倍、91倍、92倍、93倍、94倍、95倍、96倍、97倍、98倍、99倍和100倍的增加。

[0115] 第二识别分子可以是对分析物特异的识别分子。第二识别分子可以与信号放大部分偶联，并且其中信号放大部分能够诱导形成相对于捕获的分析物具有增加的光密度的不溶性聚集体。例如，在传感器芯片的表面上捕获的分析物将具有初始参照波长。在结合第二识别分子时，透射波长可移至更长的波长。当第二识别分子与信号放大部分偶联时，由于光密度的增加，透射波长可移至甚至更长的波长。

[0116] 第二识别分子可以与信号放大部分偶联。或者，第二识别分子可以与信号放大部分偶联。

[0117] 信号放大部分可以是酶。在一个实施方案中，信号放大部分是酶。该酶可以是辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、β-内酰胺酶或β-半乳糖苷酶或它们的酶促片段。在一个实施方案中，酶是辣根过氧化物酶。在一个实施方案中，第一生物识别分子与信号放大部分融合。例如，第一生物识别分子可以是与辣根过氧化物酶共价融合的抗体，辣根过氧化物酶使用本领域众所周知的技术与抗体共价连接。

[0118] 该方法还可包括使酶与酶底物接触。酶底物可以是在酶的存在下或在酶促作用下可形成不溶性产物的底物。对于辣根过氧化物酶(HRP)，可以使用3-氨基-9-乙基咔唑、3,3',5,5'-四甲基联苯胺或氯萘酚、4-氯-1-萘酚等制剂。这些底物能够在HRP的酶促反应中变成不溶性产物。

[0119] 在一个实施方案中，酶底物是3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐。

[0120] 在另一个实施方案中，信号放大部分可以是能够结合第二识别分子的第二抗体。第二抗体与第二识别分子的结合可诱导不溶性聚集体的形成。

[0121] 在一个实施方案中，第一识别分子固定在表面等离子体共振传感器芯片的表面上，其中第一识别分子能够捕获传感器芯片表面上的分析物。分析物可以是外泌体结合的或外泌体相关的生物标志物。分析物可以是外泌体结合的聚集生物标志物。第一识别分子可以对分析物具有特异性。

[0122] 在一个实施方案中，第一识别分子是抗体。例如，抗体可以是识别泛外泌体标志物或与外泌体相关或结合的标志物的抗体。例如，抗体可以是对CD63、CD9或CD81特异的抗体，CD63、CD9或CD81在外泌体中含量丰富且具有特征性。抗体还可以对细胞来源特异性标志物例如CHL1、L1CAM或NCAM具有特异性。抗体还可识别与外泌体相关或结合的生物标志物。例如，抗体可以是识别Aβ的抗Aβ抗体，或识别与外泌体结合或相关的APP、a-syn或Tau的抗体。

[0123] 术语“对照样品”是指不含分析物的样品。“对照样品”可用作与样品比较以确定样品是否包含感兴趣的分析物。

[0124] 如本文所用，术语“生物标志物”应理解为其存在或水平与感兴趣的事件相关的试剂或实体。生物标志物可以是细胞、蛋白质、核酸、肽、糖肽、外泌体或它们的组合。例如，生物标志物是Aβ42或Tau肽，其存在或水平表明个体是否患有神经变性疾病或淀粉样变性或处于发展神经变性疾病或淀粉样变性的风险。在另一个实施例中，生物标志物是外泌体结合的Aβ42或Tau肽，其存在或水平表明个体是否患有神经变性疾病或淀粉样变性或处于发

展神经变性疾病或淀粉样变性的风险。在一些实施方案中，生物标志物是外泌体相关的生物标志物。

[0125] 在一个实施方案中，提供了如本文所定义的传感器芯片用于对分析物进行检测的用途。

[0126] 在一个方面，提供了一种检测个体的神经变性疾病或淀粉样变性的方法，该方法包括：

[0127] a)将样品与本文定义的传感器芯片的表面接触；和

[0128] b)检测第二识别分子与传感器芯片的表面上捕获的分析物的结合；

[0129] 其中第二识别分子对分析物具有特异性，其中与对照个体相比，第二识别分子的结合增加表明该个体患有神经变性疾病或淀粉样变性。

[0130] 术语“个体”是指任何动物，包括任何脊椎动物或哺乳动物，特别是人，并且也可以称为例如个体或患者。

[0131] 术语“对照个体”是指已知未患有神经变性疾病或淀粉样变性的个体或没有患神经变性疾病或淀粉样变性的风险的个体。“对照个体”也可以是健康个体。“对照个体”可以是无认知障碍(NCI)的个体。该术语包括从对照个体获得的样品。

[0132] 在一个实施方案中，生物标志物是外泌体结合的或外泌体相关的生物标志物。在一个实施方案中，生物标志物是外泌体结合的聚集生物标志物。生物标志物可选自但不限于Aβ、APP、a-Syn、Tau、APOE、SOD1、TDP-43、bassoon和纤连蛋白。在一个实施方案中，Aβ是Aβ42。在另一个实施方案中，Aβ是Aβ40。在一些实施方案中，Aβ的分子亚型是Aβ42、Aβ40、Aβ39或Aβ38。在一个实施方案中，生物标志物是Tau。在一些实施方案中，生物标志物是选自CD63、CD9、CD81、ALIX、TSG101、Flotilin-1、Flotilin-2、LAMP-1、HSP70、HSP90、RNA和DNA的外泌体生物标志物。

[0133] 神经变性疾病可选自阿尔茨海默病、轻度认知障碍、血管性痴呆、血管性轻度认知障碍、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、多发性硬化、进行性核上性麻痹和/或Tau蛋白病。

[0134] 该方法还可以包括治疗发现患有神经变性疾病或淀粉样变性的个体。

[0135] 如本文所用，术语“治疗”可指(1)预防或延迟疾病的一种或多种症状的出现；(2)抑制疾病或疾病的一种或多种症状的发展；(3)缓解疾病，即引起疾病或疾病的至少一种或多种症状的消退；和/或(4)引起疾病的一种或多种症状严重性的降低。

[0136] 在一个实施方案中，术语“治疗”是指施用药物以减缓神经变性疾病或淀粉样变性的进展。

[0137] 本文提供了一种检测个体中神经变性疾病或淀粉样变性的方法，该方法包括检测获自个体的样品中外泌体结合的生物标志物的水平，其中与参照相比外泌体结合的生物标志物的水平增加表明个体患有神经变性疾病或淀粉样变性。

[0138] 在一个方面，提供了一种检测个体的神经变性疾病或淀粉样变性的方法，该方法包括检测获自个体的样品中外泌体结合的聚集生物标志物的水平，其中与参照相比外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明个体患有神经变性疾病或淀粉样变性。

[0139] 该方法可以包括检测样品中一种或多种外泌体结合的生物标志物。这允许检测存在于同一外泌体上的多种生物标志物的共定位或存在。

[0140] 生物标志物可选自但不限于Aβ、APP、a-Syn、Tau、APOE、SOD1、TDP-43、bassoon和/

或纤连蛋白。

[0141] 该方法可以包括检测外泌体结合的生物标志物的分子亚型的水平。

[0142] 在一个实施方案中，Aβ是Aβ42或Aβ40。在一些实施方案中，Aβ是Aβ42、Aβ40、Aβ39或Aβ38。

[0143] 在一个实施方案中，Aβ是前原纤维聚集体。发现前原纤维Aβ聚集体优先结合外泌体。在一个实施方案中，本文定义的方法包括检测与前原纤维Aβ聚集体结合的外泌体。

[0144] 在一个实施方案中，聚集的生物标志物是前原纤维聚集体。聚集的生物标志物可以是Aβ的前原纤维聚集体。或者，聚集的生物标志物可以是APP、a-Syn或Tau的前原纤维聚集体。

[0145] 在一个实施方案中，参照是对照个体。

[0146] 在一个实施方案中，提供了一种作为替代的测量外泌体结合以确定蛋白聚集体的前原纤维组织状态的方法，其中与对照相比，处于前原纤维组织状态的蛋白聚集体的水平增加表明个体患有神经变性疾病或淀粉样变性。

[0147] 在一个实施方案中，该方法还包括检测选自CD63、CD9、CD81、ALIX、TSG101、Flotilin-1、Flotilin-2、LAMP-1、HSP70、HSP90、RNA和DNA的外泌体生物标志物，其中外泌体生物标志物与外泌体结合的生物标志物共定位。

[0148] 在一个实施方案中，该方法进一步包括检测选自NCAM、L1CAM、CHL-1和IRS-1的神经元生物标志物，其中神经元生物标志物与外泌体结合的生物标志物共定位。

[0149] 在一个实施方案中，提供了一种测量生物标志物的不同组织和分子亚群的方法。例如，该方法可以包括测量外泌体结合的生物标志物、游离的(未结合的)生物标志物和总的(外泌体结合的和未结合的)生物标志物。该方法还可以包括测量不同生物标志物的相对浓度以更好地预测疾病。

[0150] 在一个实施方案中，神经变性疾病选自阿尔茨海默病、轻度认知障碍、血管性痴呆、血管性轻度认知障碍、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、多发性硬化、进行性核上性麻痹和/或Tau蛋白病。

[0151] 在一个实施方案中，神经变性疾病选自阿尔茨海默病和轻度认知障碍。

[0152] 该方法还可以包括治疗患有神经变性疾病或淀粉样变性的个体。

[0153] 该方法可以进一步与脑成像研究相关，例如PET成像。这包括与特定脑区成像的相关性。在一个实施方案中，提供了一种鉴定和测量与脑成像(PET)相关的循环生物标志物的方法。在一个实施方案中，提供了一种鉴定和测量与特定脑区(PET)的成像相关的循环生物标志物的方法。

[0154] 本发明基于以下发现：1)生物标志物(包括共定位的不同标志物)可用于测量和表征循环Aβ的不同分子、生物物理和组织亚群；2)血液中的循环外泌体结合的Aβ可与不同患者群体的Aβ沉积(整体平均)的PET成像密切相关；3)血液中的循环外泌体结合的Aβ可与不同患者群体的Aβ(早期AD区、扣带回区)的PET成像密切相关；4)循环外泌体结合的Aβ可以区分临床亚组(如阿尔茨海默病、轻度认知障碍、无认知障碍、血管性痴呆、血管性轻度认知障碍和急性卒中)。

[0155] 该方法可以包括向需要治疗的个体施用治疗有效量的药物。例如，药物可以是例如胆碱酯酶抑制剂，诸如多奈哌齐、利伐斯的明或加兰他敏。药物也可以是NMDA受体拮抗

剂,例如美金刚。药物可以是胆碱酯酶抑制剂和NMDA受体拮抗剂的组合,例如多奈哌齐和美金刚的组合。药物可以是BACE1抑制剂,诸如AZD3293或抗体,例如抗淀粉样蛋白抗体,如阿杜卡奴单抗。该药物也可以是抗tau药物,例如TRx0237(LMTX)。在一些实施方案中,可向需要治疗的个体施用治疗有效量的一种或多种本文所述药物、或两种或更多种本文所述药物的组合。

[0156] 在一些实施方案中,有效减少淀粉样蛋白聚集体的量的分子可以是用于治疗的潜在候选者。因此,在一些实施方案中,该方法可以包括向需要治疗的个体施用一种或多种以下分子(药物)或两种或更多种以下分子(药物)的组合:氯化甲硫铵、无色甲硫铵、双(氢甲磺酸盐)、姜黄素、酸性品红、表没食子儿茶素没食子酸酯、番红醛、刚果红、芹菜素、天蓝色C、碱性蓝41、(反式,反式)-1-溴-2,5-双-(3-羟基羰基-4-羟基)苯乙烯基苯(BSB)、芝加哥天蓝6B、-环糊精、盐酸道诺霉素、二甲基黄、直接红80、2,2-二羟基二苯甲酮、十六烷基三甲基溴化铵(C16)、氯化血红素、血红素、吲哚美辛、胡桃酮、间苯二酚蓝、磺基水杨酸甲氯黄素、褪黑激素、杨梅素、1,2-萘醌、去甲二氢愈创木酸、R()-去甲吗啡氢溴酸盐、橙G、邻香兰素(2-羟基-3-甲氧基苯甲醛)、吩嗪、酞菁、利福霉素SV、苯酚红、氢吡四环素、奎纳克林芥末二盐酸盐、硫代黄素S、ThT和三甲基(十四烷基)溴化铵(C17)、二烯丙基酒石、伊红Y、非诺贝特、新铜碱、制霉菌素、十八烷基硫酸盐和罗丹明B。

[0157] 外泌体结合的生物标志物的水平增加可以指个体和对照个体之间水平增加1.2倍或更多。术语“水平增加”也可以指选自下组的增加:1.1倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、21倍、22倍、23倍、24倍、25倍26倍、27倍、28倍、29倍、30倍、31倍、32倍、33倍、34倍、35倍、36倍、37倍、38倍、39倍、40倍、41倍、42倍、43倍、44倍、45倍46倍、47倍、48倍、49倍、50倍、51倍、52倍、53倍、54倍、55倍、56倍、57倍、58倍、59倍、60倍、61倍、62倍、63倍、64倍、65倍、66倍、67倍、68倍、69倍、70倍、71倍、72倍、73倍、74倍、75倍、76倍、77倍、78倍、79倍、80倍、81倍、82倍、83倍、84倍、85倍、86倍、87倍、88倍、89倍、90倍、91倍、92倍、93倍、94倍、95倍、96倍、97倍、98倍、99倍、100倍。

[0158] 在一个方面,提供了一种检测有患神经变性疾病风险的个体的方法,该方法包括检测获自个体的样品中外泌体结合的聚集生物标志物的水平,其中与参照相比外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明个体患有神经变性疾病。

[0159] 在一个方面,提供了一种检测和治疗个体的神经变性疾病或淀粉样变性的方法,该方法包括:

[0160] a)检测获自个体的样品中外泌体结合的聚集生物标志物的水平,其中与参照相比外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明个体患有神经变性疾病或淀粉样变性;和

[0161] b)治疗患有神经变性疾病或淀粉样变性的个体。

[0162] 在一个方面,提供了一种治疗个体的神经变性疾病或淀粉样变性的方法,该方法包括:

[0163] a)检测获自个体的样品中外泌体结合的聚集生物标志物的水平,其中与参照相比外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明个体患有神经变性疾病或淀粉样变性;和

[0164] b)治疗患有神经变性疾病或淀粉样变性的个体。

[0165] 在一个实施方案中,提供了一种检测和减缓个体神经变性疾病或淀粉样变性的进

展的方法,该方法包括:

[0166] a)检测获自个体的样品中外泌体结合的聚集生物标志物的水平,其中与参照相比外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明个体患有神经变性疾病或淀粉样变性;和

[0167] b)治疗患有神经变性疾病或淀粉样变性的个体。

[0168] 在一个方面,提供了一种确定样品中生物标志物的聚集状态的方法,该方法包括检测样品中外泌体结合的生物标志物的水平,其中与参照相比外泌体结合的生物标志物的水平增加表明生物标志物的聚集程度。

[0169] 该方法可以包括在检测外泌体结合的生物标志物的水平的步骤之前使样品与外泌体群接触的步骤。

[0170] 在一个实施方案中,与非聚集生物标志物相比,样品中聚集的生物标志物优先结合外泌体。

[0171] 样品可以从个体获得。

[0172] 在一个实施方案中,与参照相比,生物标志物的聚集程度增加表明个体患有神经变性疾病或淀粉样变性。

[0173] 该方法可以进一步包括治疗患有神经变性疾病或淀粉样变性的个体。

[0174] 在一个实施方案中,提供了一种确定样品中生物标志物的聚集状态的方法,该方法包括使样品与外泌体群接触和检测样品中外泌体结合的生物标志物的水平,其中与参照相比外泌体结合的生物标志物的增加水平表明生物标志物的聚集程度。

[0175] 本领域技术人员将理解,除了具体描述的那些之外,本文描述的发明易于进行变化和修改。应当理解,本发明包括落入精神和范围内的所有此类变化和修改。本发明还包括本说明书中单独或共同提及或指示的所有步骤、特征、组合和化合物,以及所述步骤或特征中的任何两个或更多个的任何和所有组合。

[0176] 在本说明书和随后的权利要求中,除非上下文另有要求,否则词语“包括”以及诸如“包含”和“涵盖”的变体将被理解为暗示包括所陈述的整数或步骤或整数组或步骤组,但不排除任何其他整数或步骤或整数组或步骤组。

[0177] 本说明书中对任何在先出版物(或从其衍生的信息)或任何已知事项的引用不被视为也不应被视为承认或允许或任何形式的暗示,该在先出版物(或从其衍生的信息)或已知事项构成本说明书所涉及的努力领域中的公知常识的一部分。

[0178] 现在将参照以下实施例来描述本发明的某些实施方案,这些实施方案仅用于说明的目的,并不旨在限制上文所述的一般性范围。

[0179] 实施例

[0180] 本说明书中对任何在先出版物(或从其衍生的信息)或任何已知事项的引用不被视为也不应被视为承认或允许或任何形式的暗示,该在先出版物(或从其衍生的信息)或已知事项构成本说明书所涉及的努力领域中的公知常识的一部分。

[0181] 材料和方法

[0182] 细胞培养。人类细胞系SH-SY5Y(神经元)、HUVEC(脐静脉内皮)、THP-1(单核细胞)、PC-3(前列腺上皮)和SK-OV-3(卵巢上皮)获自美国典型培养物保藏中心。GLI36(glia)和SK-OV-3在Dulbecco改良必需培养基(DMEM,Gibco)中生长。SH-SY5Y在Dulbecco改良Eagle培养基:营养混合物F-12培养基(DMEM/F12Gibco)中培养。PC-3、THP-1和HUVEC分别在F-

12K、RPMI-1640和EGM-2培养基中生长。除了补充有5％胎牛血清(FBS)的EGM-2外，所有其他培养基都补充有10％FBS和青霉素-链霉素。

[0183] 外泌体分离和定量。在收集囊泡之前，将第1-15代的细胞在耗尽囊泡的培养基(含有5％贫化的FBS)中培养48小时。所有含有外泌体的培养基都通过0.2微米的膜过滤器(Millipore)过滤，通过差速离心(首先以10,000g，随后以100,000g)分离，并用于使用APEX平台的外泌体分析。为了从血细胞和血小板中分离外泌体，血细胞来自血液分馏，血小板来自富含血小板的血浆。这些成分在HEPES缓冲盐水中洗涤，并在37℃下与2mM氯化钙和2μM钙离子载体(A23187)一起孵育以刺激外泌体的产生。然后如前所述收集所有囊泡。对于外泌体浓度的独立定量，使用了纳米微粒追踪分析(NTA)系统(NS300，Nanosight)。调整外泌体浓度以在视野中获得约50个囊泡，以实现最佳计数。为了保持一致性，所有NTA测量均使用相同的系统设置完成。

[0184] APEX传感器制造。APEX传感器是在8英寸硅(Si)晶片上制造的。简而言之，通过热氧化制备10nm二氧化硅(SiO_2)层，并通过低压化学气相沉积(LPCVD)在晶片上沉积145nm氮化硅(Si_3N_4)。涂上光刻胶后，进行深紫外(DUV)光刻以限定抗蚀剂中的纳米孔阵列图案。该图案通过反应离子蚀刻(RIE)转移到Si_3N_4膜上。移除光刻胶后，使用等离子体增强化学气相沉积(PECVD)在晶片的正面沉积一层薄薄的SiO_2保护层(100nm)。为了使光能传输，晶片的背面旋涂了光刻胶；使用光刻方法来限定感测区域。Si_3N_4和SiO_2用RIE蚀刻，然后用Si的氢氧化钾(KOH)和氢氧化四甲基铵(TMAH)蚀刻蚀刻。蚀刻后，使用稀释的氟化氢(DHF)(1∶100)移除保护性SiO_2层。最后，将Ti/Au(10nm/100nm)沉积到Si_3N_4膜上。所有纳米孔尺寸和传感器均匀性均通过扫描电子显微镜(JEOL 6701)进行表征。

[0185] 通道组装。标准软光刻用于制造多通道流通池。SU-8负抗蚀剂(SU8-2025，Microchem)用于制备模具。将光刻胶以2000rpm旋涂到Si晶片上30秒，并分别在65℃和95℃下烘烤2分钟和5分钟。紫外光曝光后，抗蚀剂在搅拌下显影前再次烘烤。在后续使用之前，开发的模具在干燥器内用三氯硅烷蒸汽化学处理15分钟。聚二甲基硅氧烷聚合物(PDMS)和交联剂以10∶1的比例混合并浇铸到SU-8模具上。在65℃下固化4小时后，从模具上切下PDMS层并组装到APEX传感器上。所有入口和出口均采用1.1毫米活检穿孔器制成，用于样品处理。

[0186] 光学设置和光谱分析。卤钨灯(StockerYale Inc.)用于通过10X显微镜物镜照射APEX传感器。透射光由光纤收集并送入光谱仪(Ocean Optics)。所有测量均在室温下在封闭的盒子中进行，以消除环境光干扰。透射光强度以相对于波长(330nm-1600nm)的计数进行数字记录。对于光谱分析，通过使用局部回归方法拟合透射峰，使用定制的R程序确定光谱峰。所有拟合都就近完成。也就是说，对于点x处的拟合，使用x附近的点进行拟合，通过它们与x的距离加权。与通过多阶多项式曲线拟合相比，该方法可以消除由于被分析的数据点数和数据范围而引起的结果变化。在确定最佳传感器几何形状时(图10)，分别使用量化峰值透射强度、峰形(半峰全宽，FWHM)和检测灵敏度的响应于折射率变化的光谱变化。测量的透射光谱证明了不同传感器之间的均匀性，s.d.在基线光谱峰位置为0.03nm。所有光谱位移(Δλ)均被确定为透射光谱峰的变化，并相对于适当的对照实验进行计算(详见下文)。

[0187] 传感器表面功能化。为了赋予APEX传感器分子特异性，制造的Au表面首先与含有长活性(羧化)硫醇-PEG和短非活性甲基化硫醇-PEG(Thermo Scientific)(1∶3活性:非活

性,PBS中10mM)的聚乙二醇(PEG)的混合物在室温下一起孵育2小时。洗涤后,表面在过量NHS/EDC溶解在MES缓冲液中的混合物中通过碳二亚胺交联激活,并与特定的探针和配体(例如,抗体和Aβ42聚集体)缀合。所有探针信息都可以在表1中找到。通过PBS洗涤移除过量的未结合的探针。缀合的传感器在4℃下储存在PBS中以备后续使用。对所有传感器表面修饰进行光谱监测以确保均匀的功能化。

[0188] 表1.分析中使用的标志物及其探针列表。

[0189]

蛋白说明	描述	抗体目录编号
Aβ42	淀粉样蛋白-β42，通过淀粉样蛋白前体蛋白的β-和γ-分泌酶连续裂解的疏水性42-肽片段。	Invitrogen, 374200; Abcam, ab34376
APP	淀粉样蛋白前体蛋白，在神经生长和修复中发挥关键作用的大膜蛋白。它富集在神经元突触中。	Fitzgerald,10R-1097; Biolegend 806001
α-syn	α-突触核蛋白，在大脑中富含并集中在突触前的神经末梢处。	Invitrogen, 32-8100; R&D 系统, AF1338

CD9	跨膜四蛋白支架糖蛋白，其在外泌体中富含并具有特征性。	BD Biosciences, 555370
CD63	III 型溶酶体膜蛋白，跨膜四蛋白家族的一员，在外泌体中富含并具有特征性。	BD Biosciences, 556019
CD81	又名 TAPA-1，在跨膜四蛋白家族中广泛表达的蛋白，已知其与整联蛋白相关联并在外泌体中具有特征性。	BD Biosciences, 555675
CHL1	L1 的密切同源物，又名类 L1 神经细胞粘附分子。在神经系统发育和突触可塑性中发挥作用，并参与信号传导路径的神经细胞外基质和细胞粘附蛋白。	R&D 系统, MAB2126, AF2126
IRS-1	胰岛素受体底物 1，一种信号传导衔接蛋白，可通过胰岛素介导对各种细胞过程的控制。	R&D 系统, MAB39781; Fitzgerald, 70R-35306
L1CAM	神经细胞粘附分子 L1。参与诸如神经元迁移、轴突生长、突触发生、髓鞘形成和神经元分化的过程的跨膜蛋白。	Invitrogen, 13-1719-82
NCAM	神经细胞粘附分子，亲同种抗原结合糖蛋白，其是一种参与神经元-神经元粘附、神经突束化、神经突外生长的细胞粘附分子。它在突触可塑性以及学习和记忆中发挥作用。	BD Biosciences, 559049; R&D 系统, AF2408
Tau	Tau，一种稳定微管的微管相关蛋白。它富含在中枢神经系统的神经元中。	研究工具 MN1000; R&D 系统, AF3494

[0190]

[0191]

靶标 miRNA 探针序列	靶标 miRNA 探针序列
miR 9	5 - UUUCGGUUAUCUAGCUUUAUUU-3 - 生物素
miR 15b	5 - UAAACCAUGAUGUGCUGCUAUU-3 - 生物素
miR 29b	5 - CACUGAUUUCAAAUGGUGCUAUU-3 - 生物素
miR 29c	5 - ACACCAGGAGAAAUCGGUCAUU-3 - 生物素
miR 107	5 - AUAGCCCUGUACAAUGCUGCUUU-3 - 生物素

[0192]

miR 146a	5 - CCCAUGGAAUUCAGUUCUCAUU-3 - 生物素
miR 181c	5 - UCACCGACAGGUUGAAUGUUUU-3 - 生物素

[0193] APEX信号放大。为了建立APEX放大，纳入了用于信号增强的不溶性光学产物的酶

促生长,并优化了光学底物浓度和反应持续时间以建立平台。简而言之,将外泌体与CD63功能化的APEX传感器(BD Biosciences)孵育10分钟。然后用生物素化的抗CD63抗体(Ancell,10分钟)标记结合的囊泡。作为对照实验,在结合的囊泡上使用等量的生物素化IgG同位素对照抗体(Biolegend)来确定放大效率。洗涤未结合的抗体后,在引入不同浓度的3,3′-二氨基联苯胺四盐酸盐(Life Technologies)作为光学底物之前,让与中性抗生物素蛋白(Thermo Scientific)偶联的高灵敏度辣根过氧化物酶与结合的囊泡反应。监测实时光谱变化以确定最佳底物浓度和反应持续时间。优化条件确定为1mg/mL,持续3分钟。用于孵育和洗涤的所有流速分别保持在3μl/min和10μl/min。通过扫描电子显微镜证实了不溶性光学产物的局部沉积。这种优化的工作流程如图11a所示。

[0194] 使用这组条件,进一步滴定已知量的外泌体并测量它们相关的APEX信号。APEX检测限被确定为可以产生检测信号=3x(来自对照的背景信号的s.d.)的最低靶标浓度。

[0195] APEX蛋白检测。所有传感器表面都用2%w/v牛血清白蛋白(BSA)封闭,以减少非特异性蛋白质结合。将外泌体引入至功能化传感器上,在室温下孵育10分钟以捕获外泌体并用PBS洗涤以移除未结合的物质。对于囊泡外蛋白靶标,如上所述,外泌体直接用检测抗体标记以进行APEX放大。对于囊泡内蛋白靶标,在用检测抗体标记之前,外泌体经过额外的固定和透化(eBioscience)。在APEX放大前后进行光谱测量,并通过定制设计的R程序进行分析。

[0196] APEX miRNA检测。APEX传感器通过其几丁质结合域用p19蛋白(New England Biolabs)功能化,并用2%w/vBSA封闭。对于miRNA检测,外泌体裂解物与生物素化RNA探针(350nM)一起孵育15分钟以与靶标miRNA链杂交。将混合物引入至结合缓冲液(1xp19结合缓冲液,pH7.0,40U RNase抑制剂,0.1mg/mLBSA)中的功能化传感器上,以实现杂交miRNA靶标/RNA探针双链体的p19捕获。将与中性抗生物素蛋白(Thermo Scientific)偶联的高灵敏度辣根过氧化物酶引入至结合的生物素化双链体中进行APEX放大。光谱测量由定制设计的R程序执行和分析。

[0197] 酶联免疫吸附测定(ELISA)。捕获抗体(5μg/ml)被吸附到ELISA板(Thermo Scientific)上并在与样品孵育之前用Superblock(Thermo Scientific)封闭。用PBST(含0.05%Tween20的PBS)洗涤后,加入检测抗体(2μg/ml)并在室温下孵育2小时。与偶联辣根过氧化物酶的第二抗体(Thermo Scientific)和化学发光底物(Thermo Scientific)孵育后,测量化学发光强度用于蛋白质检测(Tecan)。

[0198] 蛋白质印迹。通过超速离心分离的外泌体在含有蛋白酶抑制剂(Thermo Scientific)的放射免疫沉淀测定(RIPA)缓冲液中裂解并使用二辛可宁酸测定(BCA测定,Thermo Scientific)定量。蛋白质裂解物通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF,Invitrogen)上并用针对蛋白质标志物的抗体进行免疫印迹:HSP90(Cell Signaling)、HSP70(BioLegend)、Flotillin 1(BD Biosciences)、CD63(Santa Cruz)、ALIX(Cell Signaling)、TSG101(BD Biosciences)、LAMP-1(R&D Systems)和神经元标记NCAM(R&DSystems)。与辣根过氧化物酶偶联的第二抗体(CellSignaling)孵育后,增强的化学发光用于免疫检测(Thermo Scientific)。

[0199] 蛋白质聚集。冻干的NH_4OH处理的Aβ42蛋白(rPeptide)重新悬浮在NaOH(60mM,4℃)中,超声处理并在PBS34中将pH调节至pH7.4。蛋白质立即通过0.2微米的膜过滤器

(Millipore)过滤,滤液用作较小的Aβ42聚集体。为了制备更大的Aβ42聚集体,如上所述处理蛋白质并在搅拌下孵育1小时以诱导进一步聚集,然后通过0.2微米膜过滤器(Millipore)过滤。滤液用作大的Aβ聚集体。为了制备类似大小的BSA聚集体作为对照,将2%w/vBSA溶解在PBS中,在80℃下加热1小时和2小时,以分别诱导小的和大的对照聚集体聚集。

[0200] 聚集体粒度测定。Aβ42和BSA聚集体的流体动力学直径通过动态光散射分析(Zetasizer Nano ZSP,Malvern)测定。3x14次测量运行在4℃下进行。分析Z-平均直径和多分散性。对于每次测量,监测自相关函数和多分散指数以确保用于尺寸测定的样品质量。

[0201] 外泌体-Aβ结合的表征。如前所述,制备的蛋白聚集体(Aβ42和BSA对照)通过EDC/NHS耦合用于APEX传感器的表面功能化。未结合的蛋白聚集体用PBS洗掉。从所得的透射光谱位移测量结合的蛋白质的量。该信息用于确定结合的蛋白聚集体的数量及其相关的外泌体结合总蛋白表面积(详细信息见下文),以便对结合亲和力进行归一化。在用蛋白聚集体进行表面功能化后,将外泌体(10^{10}/ml)引入至传感器上。每3秒测量一次光谱变化,总持续时间为480秒,以构建实时动力学传感图。确定不同大小的蛋白聚集体的外泌体结合动力学和结合亲和力。

[0202] 为了说明蛋白聚集体的大小差异以及SPR相关的灵敏度指数衰减(随着与感测表面的距离增加),使用以下等式

[0203] $$S = E \times \int_0^{2r} \pi \left[r^2 - (r-z)^2 \right] \times e^{(-2z/l_d)} dz$$

[0204] 来计算与外泌体相互作用的结合聚集体的总表面积:其中S是信号,z是与传感器表面的距离,E是z=0处的电场,在这种情况下为常数,l_d是衰减长度,在当前传感器设计中设置为200nm,r是结合蛋白聚集体的半径。

[0205] 所有蛋白聚集体都近似为球体,由透射电子显微照片(图3b,左)支持,并且它们的r由动态光散射分析确定。上述等式用于确定结合到传感器上的蛋白聚集体的数量以及它们各自的总表面积,以估计与外泌体相互作用的可用结合位点的数量。所有外泌体结合数据(Δλ)均针对它们各自的蛋白质结合位点进行归一化。归一化的Aβ42结合数据是相对于类似大小的BSA对照进行的,并拟合以确定结合亲和力常数KD。

[0206] 扫描电子显微镜。所有样品均用半强度卡诺夫斯基固定液固定,并用PBS洗涤两次。在一系列递增浓度的乙醇中脱水后,在用扫描电子显微镜(JEOL 6701)成像之前,样品被转移用于临界干燥(Leica)并随后用金(Leica)溅射涂层。

[0207] 透射电子显微镜。外泌体用金纳米微粒(15nm,Ted Pella)进行免疫标记,用2%多聚甲醛固定并转移到铜网格(Ted Pella)上。洗涤结合的囊泡并用草酸双氧铀和甲基纤维素混合物进行对比染色。干燥的样品用透射电子显微镜(JEOL 2200FS)成像。

[0208] 临床样品采集。该研究得到了NUH和NUS机构审查委员会(2015/00441、2015/00406和2016/01201)的批准。所有受试者均根据机构审查委员会批准的协议在知情同意的情况下招募。所有招募的受试者在国立大学医院(NUH,新加坡)进行几项神经心理学评估,包括迷你精神状态检查(MMSE)、蒙特利尔认知评估(MoCa)和血管性痴呆库(VDB)认知评估。AD、MCI或NCI的临床诊断是通过神经心理学评估以及临床特征和血液调查的评估得出的。VaD

和VMCI的临床诊断是通过结合神经心理学评估、中风临床病史和通过磁共振成像(MRI)观察到的脑血管疾病程度来得出的。所有临床评估和分类均根据已发布的标准46-48进行,且与APEX测量无关。急性中风血浆样品是在入院24小时内从诊断为中风的患者中收集的。纵向血浆样品是在一年的随访期间从患者身上收集的,没有进行PET脑成像。对于血浆采集,在注入PET放射性示踪剂(如适用)之前,从受试者身上抽取静脉血(5ml),放入EDTA管中并立即处理。简而言之,将所有血样以400g(4℃)离心10分钟。在不干扰血沉棕黄层的情况下转移血浆,并以1,100g(4℃)再次离心10分钟。在使用APEX平台进行测量之前,所有血浆样品都经过去标识化处理并储存在-80℃。所有APEX测量都是在不了解PET成像结果和临床诊断的情况下进行的。

[0209] 临床APEX测量。根据补充图15a中概述的测定配置测量所有血浆样品。简而言之,为了测量外泌体结合的Aβ42群,我们直接使用天然血浆样品,通过Aβ42捕获和CD63检测(Aβ42+CD63+),无需任何囊泡纯化或分离。为了说明血浆样品中存在未结合的Aβ42群,我们使用尺寸排阻过滤(截止尺寸=50nm,Whatman)移除大尺寸的渗余物。这是必要的,因为基于Aβ42捕获和Aβ42检测的测定配置无法区分未结合的Aβ42和总的Aβ42。为了测量未结合的Aβ,我们通过Aβ42捕获和Aβ42检测(Aβ42+Aβ42+)评估了血浆滤液。请注意,此过滤仅用于证明未结合的Aβ42群的存在;其在临床环境中是不必要的,在临床环境中直接从天然血浆样品中仅测量更具反射性的外泌体结合的Aβ42。为了测量总的Aβ42,我们直接通过Aβ42捕获和Aβ42检测(Aβ42+Aβ42+)评估了天然血浆样品。对于所有测量,我们使用5%BSA作为APEX传感器的封闭剂。我们还包括一个样品匹配的阴性对照,其中我们在用IgG同种型对照抗体功能化的对照传感器上孵育相同的样品。所有测量均相对于该IgG对照进行,以说明样品匹配的非特异性结合。

[0210] 正电子发射断层扫描(PET)成像。抽血后,使用西门子3T Biograph mMR系统(Siemens Healthineers)对受试者进行扫描,以同时获得PET和MR图像。在静脉输注370MBq的11C-匹兹堡化合物B(PiB)后40-70分钟获取PET数据。使用12通道头部接收线圈获取MR数据,包括用于PET衰减校正的超短回波时间(UTE)图像和T1加权磁化准备梯度回波(MPRAGE)图像(1mm各向同性分辨率,TI/TE/TR=900/3.05/1950毫秒)。

[0211] PET数据分析。使用Freesurfer(5.3.0)处理T1加权MPRAGE图像以生成用于PET数据分析的皮质分割。PET图像使用普通泊松有序子集期望最大化(OP-OSEM)算法重建,并使用4mm高斯滤波器平滑。使用基于UTE的μ-map对数据进行衰减。然后使用高级归一化工具(ANT)将产生的衰减校正的标准化摄取值(SUV)图像与MPRAGE图像共同配准,并且使用受试者特异性的Freesurfer分割来计算相对于平均小脑灰质强度的标准化摄取值比率(SUVR)。计算特定区域的平均SUVR,并通过平均化所有大脑区域的SUVR计算每个患者的整体平均SUVR。

[0212] 统计分析。所有测量均一式三份进行,数据显示为平均值±s.d.。显著性检验是通过双尾学生t检验进行的。对于样品间比较,每对样品都进行了测试,并且使用Bonferroni校正针对多重假设检验调整了所得P值。将调整后的P<0.05的值确定为显著的。单向成对ANOVA检验用于确定变化的分析和生物学系数(即,组内、组间和总体)。对于临床研究,使用线性回归进行相关性以确定拟合优度(R2)。所有统计分析均使用R-package(版本3.4.2)和Graphpad Prism7进行。

[0213] 实施例1

[0214] 外泌体结合的Ap的放大的等离子体分析

[0215] AD最早的病理标志之一是脑部的Aβ沉积。这些斑块由异常淀粉样蛋白片段的聚集形成,主要是疏水性剪接变体Aβ42。Aβ蛋白被释放到细胞外空间并可以在血液中循环。在细胞外空间中也发现,外泌体是哺乳动物细胞通过多囊泡内体与质膜融合分泌的纳米级膜囊泡。在此外泌体生物发生过程中,糖蛋白和糖脂被纳入内陷的质膜中,并被分类到新形成的外泌体10,11中。通过这些表面标志物,外泌体可以与细胞外的Aβ蛋白相关联并结合(图1a)。源自神经元来源(SH-SY5Y细胞)的细胞外囊泡的多模态表征证实了它们的外泌体形态、大小分布和分子组成(图5)。

[0216] 囊泡的透射电子显微镜分析进一步揭示了它们与Aβ42蛋白聚集体结合的能力(图1b和图5)。

[0217] 为了评估外泌体Aβ的结合,开发了APEX平台用于外泌体分子共定位的放大、多参数分析。该系统通过周期性的等离子体纳米孔阵列测量传输SPR,在双层光子结构中形成图案,并使用原位酶促转化在结合的外泌体上快速生长不溶性光学产物(图1c)。为了补充APEX酶促沉积(发生在传感器顶部),尺寸匹配的等离子体纳米孔在耦合的双层光子系统中形成图案,以通过背面照射(远离酶活性,图20)增强SPR测量。由此产生的酶促沉积不仅稳定地改变了SPR信号放大的折射率,正如透射光谱中的红移所证明的那样(光谱位移Δλ,图1d),但也在空间上定义为分子共定位分析。APEX放大前后传感器结合的外泌体的扫描电子显微照片证实了酶促转化后光学沉积物的局部生长(图6)。

[0218] 因此,使用开发的APEX平台,可以直接从AD患者和对照受试者的临床血样中测量Aβ蛋白与外泌体的结合,并将测量结果与整体和区域脑斑块沉积的PET成像相关联(图1e)。对于高通量、多路临床分析,采用先进的制造方法(即深紫外光刻,图7)在8英寸晶片上制备传感器微阵列;每个晶片可容纳40多个微阵列芯片,具有>2000个传感元件(图8a)。图1f显示了本研究中用于平行测量的开发的APEX微阵列芯片的照片。开发的传感器的扫描电子显微照片显示出高度均匀的制造(图8b)。

[0219] 多重分析的优化信号放大

[0220] 首次开发了酶促APEX放大。进行了一系列传感器功能化,即抗体偶联、外泌体结合、酶标记和光学产物放大,并测量了逐步总光谱位移(累积Δλ,图2a)。该传感器使用针对CD63的抗体进行功能化,CD63是一种在外泌体中富含的III型溶酶体膜蛋白,具有外泌体的特征,以捕获源自神经元细胞(SHSY5Y)的囊泡。为了促进不溶性光学产物的局部沉积,辣根过氧化物酶作为级联酶被掺入并用于催化其可溶性底物(3,3′-二氨基联苯胺四盐酸盐)的转化。传感器结合的囊泡通过另一种抗CD63抗体进行酶标记。虽然酶标记没有引起任何显著的光谱变化,但光学产物的形成导致了约400%的信号增强。相比之下,使用IgG同位素对照抗体的对照实验显示出最小的背景变化(图9)。重要的是,这种SPR信号放大与高度局部化的光学沉积物的面积覆盖率增加密切相关,正如扫描电子显微镜所证实的那样(图2b)。

[0221] 为了补充酶促放大(发生在传感器顶部),优化APEX传感器设计以提高其分析性能和稳定性。与仅支持正面照射的已建立的镀金玻璃设计(图20)相比,APEX的双层等离子体结构能够通过背面照射实现SPR激发(图2c)。新的优化设计不仅通过背面照射显示出强透射SPR(图10a-c),而且还表现出分析稳定性(图10d),这可能是由于减少了对酶活性的直接

入射光(即温度波动)所致。通过优化酶底物浓度以及反应持续时间进一步建立了APEX测定(图2d)。通过恒定背面照射,监测与不同底物浓度相关的实时光谱变化,发现可以在＜10分钟内完成大量信号放大,从而使整个APEX工作流程在＜1小时内完成。

[0222] 在这些优化条件下,接下来测量APEX检测灵敏度以进行外泌体定量。神经元衍生的囊泡(SH-SY5Y)用标准纳米微粒跟踪分析进行量化。使用抗CD63抗体,我们进行了滴定实验(图2e)。确定优化的APEX放大可以将检测灵敏度提高10倍,建立检测限(LOD)～200个外泌体。这种观察到的灵敏度是迄今为止针对批量外泌体测量报告的最佳LOD,并且分别比蛋白质印迹和化学发光ELISA好10^5倍和10^3倍。

[0223] 使用微阵列APEX平台,进一步开发了测定用于与神经变性疾病相关的多种标志物的分析。针对以下蛋白质标志物建立了特定测定(图2f):淀粉样蛋白β(Aβ42)、淀粉样前体蛋白(APP)、α-突触核蛋白(a-syn)、L1的密切同源物(CHL1)、胰岛素受体底物1(IRS-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)和tau蛋白。重要的是,通过进一步开发APEX测定工作流程(图11a),该平台展示了检测囊外和囊内蛋白质以及外泌体miRNA的信号放大能力(图11b)。用于测定开发的所有检测探针都可以在表1中找到。

[0224] 增强Aβ聚集体和外泌体之间的结合

[0225] 使用开发的APEX平台,接下来评估外泌体与不同结构形式的病理性Aβ蛋白的结合。为了模拟淀粉样蛋白接种和纤维化的各个阶段,制备了不同大小的Aβ42聚集体,这是淀粉样蛋白斑块的主要成分。改变聚集程度以形成不同大小的Aβ42聚集体(图3a,详见实验方法),它们的球状形态和单峰尺寸分布分别通过透射电子显微镜和动态光散射分析得到证实(图3b)。进一步指出,较大的Aβ42聚集体表现出形成纤维状结构的强烈倾向(图12)。

[0226] 为了确定外泌体-Aβ结合的动力学,将制备的Aβ42聚集体固定在APEX平台上,并将传感器与等浓度的神经元衍生外泌体一起孵育(图3c)。相比之下,在对照实验中,制备并表征了类似大小的牛血清白蛋白(BSA)聚集体(图13)。通过测量实时外泌体结合,证明无论聚集体大小如何,与类似大小的BSA对照相比,外泌体与Aβ42聚集体的结合更强烈(图3d)。更重要的是,与囊泡对较小Aβ42聚集体的结合亲和力(图3d,左)相比,囊泡对较大的Aβ42聚集体显示出显著更高的结合亲和力(＞5倍)(图3d,右)。所有亲和力都针对Aβ42聚集体表面积进行归一化,并相对于各自的BSA对照进行(详见方法)。

[0227] 接下来,使用源自不同细胞来源的细胞外囊泡,利用APEX平台来测量它们各自与更大的Aβ42聚集体的结合(图3e)。如通过纳米微粒追踪分析(图14)所确定的,将来自不同细胞来源的相同浓度的囊泡与Aβ42功能化传感器一起温育。注意到在所有测试的细胞来源中,神经元、红细胞、血小板和上皮细胞衍生的囊泡被证明与Aβ42聚集体表现出更强的结合,而神经胶质和内皮细胞衍生的囊泡显示出可忽略不计的结合。一组针对这些各自细胞来源的特异性标志物以及泛外泌体标志物(即CD63)接下来用于结合囊泡的APEX信号放大。CD63在所有测试的囊泡中始终如一地执行信号增强。通过这种标志物鉴定,CD63因此被用于开发APEX测定以鉴定和测量外泌体结合的Aβ(定义为Aβ42+CD63+;图15)。

[0228] 血液外泌体结合的Aβ揭示的脑斑块负荷

[0229] 鉴于外泌体与前原纤维Aβ聚集体(淀粉样蛋白斑块的构建块)之间的结合增强,推测外泌体结合的Aβ可以作为脑斑块负荷更具反射性的循环生物标志物。为了检验这一假设,用各种抗体开发了不同的APEX测定法,以评估来自临床血样的不同循环Aβ42群(图

15a)。具体来说,为了表征外泌体结合的Aβ42群,APEX测定法被设计为直接从天然血浆中富集Aβ42,并测量与捕获的Aβ42相关的CD63的相对量。这种测定配置不仅显示了对Aβ42+CD63+群的特异性检测(图15b-c),而且还反映了功能相关性:随着前原纤维Aβ聚集体和外泌体之间的结合增强,相关的CD63信号可以被视为替代指标以测量总循环Aβ42中前原纤维Aβ42的相对量。为了说明未结合的Aβ42群的存在,在测量血浆滤液中的Aβ42之前,使用尺寸排阻过滤移除血浆中的大尺寸滞留物(例如外泌体)。最后,为了测量总循环Aβ42,通过直接Aβ42富集和Aβ42检测来评估天然血浆。

[0230] 我们接下来进行了一项可行性临床研究,旨在解决以下关键问题:(1)APEX能否测量直接来自血样中的循环Aβ42,(2)不同血源性Aβ42群与脑斑块负荷的相关性如何,以及(3)循环Aβ42的特定群能否区分不同的临床群体?

[0231] 为了实现这些靶标,招募年龄匹配的受试者(n=84),诊断为AD的受试者(n=17)、轻度认知障碍的受试者(MCI,n=18)、无认知障碍的健康对照(NCI,n=16)、以及血管性痴呆的临床对照(VaD,n=9)和神经血管损害的临床对照(即血管轻度认知障碍,VMCI,n=12;急性中风,n=12)。所有临床信息见表2。招募所有受试者进行血液采样和APEX分析。除急性中风患者外,所有受试者还同意同时进行脑淀粉样斑块的PET成像。就在输注匹兹堡化合物B(PiB)放射性示踪剂用于PET成像之前收集血浆样品。在成像的临床组之间和内部,PET成像显示了宽范围的脑斑块负荷(图4a)并证明了脑部区域变化(表2),这与其他已发表的临床研究一致。

[0232] 表2.临床信息和PET成像标准化摄取值比率(SUVR)。

[0233]

招募诊断	受试者数量 n=84	女性 (%)	男性 (%)	年龄范围	中值年龄	标准化摄取值比率(SUVR)				
						左-后扣带回	右-后扣带回	左-枕部	右-枕部	整体平均
阿尔茨海默病(AD)	17	14(82%)	3(18%)	57-89	76	1.26-2.58	1.28-2.51	1.17-1.94	1.20-1.97	1.18-2.14

[0234]

轻度认知障碍(MCI)	18	7(39%)	11(61%)	58-82	75	1.05-2.66	1.11-2.54	1.07-1.84	1.05-2.28	1.06-2.26
无认知障碍(NCI)	16	7(44%)	9(56%)	55-83	75	1.12-1.97	1.02-2.18	1.07-1.48	1.07-1.73	1.09-1.74
血管性痴呆(VaD)	9	5(56%)	4(44%)	59-91	76	0.93-1.41	0.90-1.32	0.92-1.54	0.92-1.52	1.03-1.35
血管性轻度认知障碍(VMCI)	12	7(58%)	5(42%)	62-81	72	1.04-2.20	1.01-2.14	1.04-1.65	1.05-1.65	1.06-2.02
急性中风	12	匿名和去识别的				未执行淀粉样蛋白板块的 PET 成像				

[0235] AD:阿尔茨海默病,MCI:轻度认知障碍,NCI:无认知障碍,

[0236] VaD:血管性痴呆,VMCI:血管性轻度认知障碍。使用开发的APEX测定法(图11a),我们评估了这些临床血浆样品中不同的循环Aβ42群,即外泌体结合的Aβ42、未结合的群以及总循环Aβ42(图4b)。外泌体结合的Aβ42群显示出与外泌体标志物(即CD63、CD9和CD81)和神经元标志物(即NCAM、L1CAM和CHL-1)的强烈共定位信号,表明神经元外泌体可以构成相当大比例的群(图16a)。作为未结合的Aβ42,从血浆滤液中进行测量,我们进一步表征了这些滤液并证实它们的囊泡计数可以忽略不计,并且与外泌体和神经元标志物的共定位信号最

小(图16b-c)。当与整体PET淀粉样蛋白成像相关时,与未结合的Aβ42(图4b,中间,R^2=0.0193)或总Aβ42(图4b,右,R^2=0.1471)相比,外泌体结合的Aβ42测量显示最佳相关性(图4b,左,R^2=0.9002)。有趣的是,由总Aβ42测量值(如本研究以及其他已发表的报告所示)所显示的不良和负相关不同,来自外泌体结合的Aβ42群的相对CD63测量值显示出与脑淀粉样蛋白斑块的PET成像高度相关和正相关。我们将这一发现归因于外泌体和PET示踪剂对Aβ42的类似结合偏好:(1)外泌体显示出与前原纤维Aβ42聚集体的结合增强,特别是可以容易形成原纤维的较大聚集体(图3d),和(2)PET示踪剂与较大的淀粉样原纤维强烈结合,但与较小的聚集体几乎没有结合。值得注意的是,这种优越的相关性也证明了大脑区域的特异性;外泌体结合的Aβ42测量结果显示,与枕部区域(晚期AD受影响区域,图17b)相比,扣带回区(早期AD受影响区域,图17a)与脑斑块负荷的相关性更强。

[0237] 在区分临床诊断时,只有外泌体结合的Aβ42的APEX分析,而不是未结合的群或总Aβ42群的APEX分析,表现出良好的特异性(图4d)。特别是,外泌体结合的Aβ42测量值不仅可以区分AD临床组(即AD和MCI,P<0.01),还可以区分其他健康和临床对照(P<0.0001,学生t检验)。在区分各种临床组方面,该证明的特异性与PET脑淀粉样蛋白成像的特异性相当(图18)。在另一个方面,血浆细胞外囊泡的纳米微粒追踪分析没有显示所有临床组的囊泡大小或浓度有任何显著差异(图19)。

[0238] 实施例2

[0239] AD是严重痴呆症的最常见形式。由于其复杂和渐进的神经病理学,早期检测和及时干预对于疾病改善疗法的成功至关重要。尽管人们对寻找AD的血清学生物标志物有着浓厚的兴趣,但它们的发展受到了一些挑战的困扰。首先,与脑脊液中的对应物不同,循环中的病理性AD分子的浓度要低得多。血浆Aβ水平往往接近常规ELISA测定的检测下限;这一限制可能导致已发表报告中的几个相互矛盾的发现。其次,血浆Aβ分析与脑斑块沉积之间几乎没有相关性,脑斑块沉积是AD最早的病理标志。一个可能的原因可能来自不同的测量方法。通常用于确定脑淀粉样蛋白负荷的PET成像探针优先测量不溶性纤维状沉积物,而传统ELISA测量血浆中的可溶性Aβ。此外,之前的整体血液测量可能掩盖了基于血液的测量与脑病理学的潜在相关性。然而,这种差异带来一个更基本的问题——是否有循环Aβ蛋白的亚群可以更好地反映大脑中的纤维状病理。

[0240] 开发了用于对直接来自血浆的外泌体结合的Aβ、未结合的Aβ和总Aβ进行多参数分析的专用分析平台(APEX),以区分不同的循环Aβ群。具体来说,它利用传感器设计、设备制造和测定开发方面的新进展来实现增强的光学性能和检测能力(图20)。在传感器设计和制造方面,APEX平台构成了金纳米孔的周期性阵列,悬浮在图案化的氮化硅膜上,并通过用于大规模、精确的纳米图案化的现有技术制造方法深紫外光刻技术制造。这些进步推动APEX技术实现1)改进的光学性能(即增强的透射强度以通过双向光照射实现SPR检测)和2)可靠的大规模生产。在测定技术方面,APEX平台利用快速的原位酶促转化来实现高度局部化的放大信号。这一发展不仅能够灵敏地检测不同的靶标(例如,囊内蛋白质和RNA靶标),而且有助于多参数群体研究的外泌体共定位分析,因为只有当多个靶标同时存在于外泌体时才会在局部形成不溶性沉积物。通过这些综合进步,观察到的APEX灵敏度是迄今为止外泌体分析报告中最好的,并且超过了标准ELISA测量几个数量级。使用开发的APEX平台,我们证明了外泌体与更大的前原纤维前Aβ(纤维状淀粉样蛋白斑块的关键构建块)之间的结合增

强。在临床血浆样品中进一步鉴定和量化了外泌体结合的淀粉样蛋白(CD63+Aβ42+)亚群，发现在不同的临床人群(即AD、MCI、认知正常对照和与其他神经变性疾病和神经血管疾病的临床对照)中这些样品与脑淀粉样蛋白斑块负荷高度相关。

[0241] 评估不同的循环Aβ群可能会导致AD研究和临床护理的范式转变。越来越多的证据支持前原纤维Aβ聚集体可以作为AD神经变性的有毒驱动因素起作用。它们与外泌体的优先结合，以及最近关于人类淀粉样蛋白斑块中外泌体标志物富集的发现，不仅揭示了斑块播种的可能新机制，而且表明了外泌体结合的Aβ作为复杂AD病理的更具反射性的循环生物标志物的重要性。因此，预想到本研究可以在技术开发和生物标志物改进方面补充其他临床前和临床研究。例如，在技术发展方面，虽然IP质谱法能够实现无偏见的分子筛选，并且对于生物标志物的发现、尤其是在检测不同的分子同种型和变体(例如(APP)669-711和Aβ1-40)方面很有价值，APEX技术可从天然血浆样品中提供快速、灵敏的读数，无需进行质谱测量通常所需的大量样品处理，因此适用于有针对性的临床测量。在生物标志物的改进方面，正如目前的研究所证明的那样，对不同的循环Aβ群的分析可以揭示以前被全血测量掩盖的新的相关性，并推动未来基于血液的AD临床管理。重要的是，目前有超过400项AD临床试验，进一步设想可以加强开发的方法，以重新定义当前的患者护理标准。通过额外的技术创新，例如芯片上外泌体处理、其他AD标志物的组合分析以及纵向临床队列验证，开发的技术可以提供促进微创早期检测、分子分层和连续监测的综合能力，所有这些对于在临床试验的不同阶段客观评估疾病改善疗法至关重要。

[0242] 实施例3

[0243] 这个实施例表明，用抑制剂孵育淀粉样蛋白聚集体减少了自发的蛋白质聚集。

[0244] 方法

[0245] 聚集体尺寸测定。淀粉样蛋白和BSA聚集体的流体动力学直径通过动态光散射分析(Zetasizer Nano ZSP,Malvern)确定。3×14次测量运行在4℃下进行。分析Z-平均直径和多分散性。对于每次测量，自相关函数和多分散指数都受到监测，以确保用于尺寸测定的样品质量。

[0246] 蛋白质聚集。将冻干的淀粉样蛋白重新悬浮在NaOH(60mM,4℃)中，进行超声处理，并在PBS中将pH调节至pH 7.4。蛋白质立即通过0.2微米的膜过滤器(Millipore)过滤，滤液用作小的初始聚集体。为了制备更大的聚集体，如上所述处理蛋白质并在搅拌下孵育1小时以诱导进一步聚集。对于用抑制剂的治疗，在孵育前将10μM抑制剂(例如亚甲蓝)加入蛋白质中。在孵育结束时进行聚集体大小测定。

[0247] 光学分析。为了进行实验分析，使用卤钨灯(StockerYaleInc.)通过a×10显微镜物镜背照APEX传感器。透射光由光纤收集并送入光谱仪(Ocean Optics)。全部测量在室温下，在封闭的盒子中进行，以消除环境光干扰。透射光强度以相对于波长的计数进行数字记录。对于光谱分析，通过使用局部回归方法拟合透射峰，使用定制的R程序确定光谱峰。所有拟合都就近完成。也就是说，对于点x处的拟合，使用x附近的点进行拟合，由它们与x的距离加权。与通过多阶多项式曲线拟合相比，该方法可以消除由被分析的数据点数和数据范围而引起的结果变化。所有光谱位移(Δλ)都被确定为透射光谱峰的变化，并相对于适当的对照实验进行计算。

[0248] 外泌体-蛋白质结合的表征。如前所述，制备的蛋白聚集体(Aβ42和BSA对照)通过

EDC/NHS耦合用于APEX传感器上的表面功能化。未结合的蛋白聚集体用PBS洗掉。从所得的透射光谱位移测量结合的蛋白质的量。我们使用此信息来确定结合的蛋白聚集体的数量及其相关的外泌体结合的总蛋白表面积(详见下文信息),以便对结合亲和力进行归一化。在用蛋白聚集体进行表面功能化后,将外泌体引入至传感器上。每3秒测量一次光谱变化,总持续时间为480秒,以构建实时动力学传感图。外泌体结合动力学和结合亲和力被确定为不同大小的蛋白聚集体。

[0249] 为了说明蛋白聚集体的大小差异以及SPR相关的灵敏度指数衰减(随着与传感器表面的距离增加),使用等式

[0250] $$S = E \times \int_0^{2r} \pi \left[r^2 - (r-z)^2 \right] \times e^{(-2z/l_d)} dz$$

[0251] 计算与外泌体相互作用的结合聚集体的总表面积:其中S是信号,z是距传感器表面的距离,E是z＝0处的电场,在这种情况下为常数,l_d是衰减长度,在当前传感器设计中设置为200nm,r是结合蛋白聚集体的半径。

[0252] 所有蛋白聚集体都近似为球体,它们的r由动态光散射分析确定。我们使用上述等式来确定结合到传感器上的蛋白聚集体的数量以及它们各自的总表面积,以估计与外泌体相互作用的可用结合位点的数量。所有外泌体结合数据(Δλ)均针对它们各自的蛋白质结合位点进行归一化。归一化的Aβ42结合数据是相对于类似大小的BSA对照进行的,并拟合以确定结合亲和力常数K_D。

[0253] miRNA分析。外泌体裂解物与生物素化的RNA探针一起孵育,然后在p19功能化的APEX传感器上捕获RNA双链体并放大APEX信号。

[0254] 结果

[0255] 许多神经变性疾病(阿尔茨海默病、帕金森病和肌萎缩侧索硬化)的病理学涉及错误折叠的淀粉样蛋白的聚集。靶向蛋白质聚集的治疗涉及清除聚集的淀粉样蛋白的各种策略,包括分解淀粉样蛋白的聚集体或抑制淀粉样蛋白的聚集。已被证明可有效减少淀粉样蛋白聚集体数量,并因此是疾病改善疗法的潜在候选者的分子,包括氯化甲硫鎓、无色甲硫鎓双(氢甲磺酸盐)、姜黄素、酸性品红、表没食子儿茶素没食子酸酯、番红花醛、刚果红、芹菜素、天蓝C、碱性蓝41、(反式,反式)-1-溴-2,5-双-(3-羟基羰基-4-羟基)苯乙烯基苯(BSB)、芝加哥天蓝6B、-环糊精、盐酸道诺霉素、二甲基黄、直接红80、2,2-二羟基二苯甲酮、十六烷基三甲基溴化铵(C16)、氯化血红素、血红素、吲哚美辛、胡桃酮、间苯二酚蓝、磺基水杨酸甲氯黄素、褪黑激素、杨梅素、1,2-萘醌、去甲二氢愈创木酸、R()-去甲吗啡氢溴酸盐、橙G、邻香兰素(2-羟基-3-甲氧基苯甲醛)、吩嗪、酞菁、利福霉素SV、苯酚红、氢吡四环素、奎纳克林芥末二盐酸盐、硫代黄素S、ThT和三甲基(十四烷基)溴化铵(C17)、二烯丙基酒石、伊红Y、非诺贝特、新铜碱、制霉菌素、十八烷基硫酸盐和罗丹明B。

[0256] 由于没有动物模型被证明表现出反映人脑AD病理的准确病理,我们利用体外实验来模拟疾病改善治疗在抑制淀粉样蛋白聚集方面的作用。淀粉样蛋白的初始大小通过动态光散射分析确认,然后将等分的蛋白质与或不与抑制剂一起温育。在没有抑制剂的情况下,由于淀粉样蛋白的自发聚集,蛋白聚集体的大小随着孵育时间的增加而增大。然而,在抑制剂存在的情况下,由于自发蛋白质聚集而导致的尺寸增加很小,导致形成较小的蛋白聚集

体。

[0257] 孵育后，淀粉样蛋白在与神经元外泌体孵育之前被功能化到传感器芯片的表面。观察到神经元外泌体优先与较大的蛋白聚集体结合，如结合亲和力的差异所示，并证明与抑制剂处理的较小蛋白聚集体的结合减少。由于外泌体与蛋白质的结合可以作为蛋白质生物物理和/或生化特性的替代指标——这些特性受疾病改善疗法的影响——APEX平台能够评估疾病改善疗法的功效。

[0258] 已经描述了几个示例配置，可以在不脱离本公开的精神的情况下使用各种修改、替代构造和等效物。例如，上述要素可以是更大系统的组件。此外，可以在考虑上述要素之前、之中或之后采用许多步骤。

[0259] 在此引用的所有出版物、序列登录号、专利和专利申请出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0260] 本公开的示例性实施方案

[0261] 在一些方面和实施方案中，本文描述的是：

[0262] 一种检测受试者神经变性疾病或淀粉样变性的方法，该方法包括检测获自受试者的样品中外泌体结合的聚集生物标志物的水平，其中与参照相比，外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明受试者患有神经变性疾病或淀粉样变性。

[0263] 在一些实施方案中，生物标志物选自由Aβ、APP、a-Syn、Tau、APOE、SOD1、TDP-43、bassoon和/或纤连蛋白组成的组。

[0264] 在一些实施方案中，该方法包括检测外泌体结合的生物标志物的分子亚型的水平。

[0265] 在一些实施方案中，Aβ的分子亚型是Aβ42、Aβ40、Aβ39或Aβ38。

[0266] 在一些实施方案中，生物标志物是前原纤维聚集体。

[0267] 在一些实施方案中，该方法还包括检测选自由CD63、CD9、CD81、ALIX、TSG101、Flotilin-1、Flotilin-2、LAMP-1、HSP70、HSP90、RNA和DNA组成的组的外泌体生物标志物，其中外泌体生物标志物与外泌体结合的生物标志物共定位。

[0268] 在一些实施方案中，该方法进一步包括检测选自由NCAM、L1CAM、CHL-1和IRS-1组成的组的神经元生物标志物，其中神经元生物标志物与外泌体结合的生物标志物共定位。

[0269] 在一些实施方案中，神经变性疾病选自下组：阿尔茨海默病、轻度认知障碍、痴呆、血管性痴呆、血管性轻度认知障碍、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、多发性硬化、进行性核上性麻痹和/或Tau蛋白病。

[0270] 在一些实施方案中，神经变性疾病选自由阿尔茨海默病和轻度认知障碍组成的组。

[0271] 在一些实施方案中，该方法包括治疗患有神经变性疾病或淀粉样变性的受试者。

[0272] 在一些实施方案中，样品是组织活检样品、血液、血浆、血清或脑脊液。

[0273] 在一些实施方案中，该方法进一步与脑成像研究相关。

[0274] 在另一个方面，本文描述了一种检测有患神经变性疾病或淀粉样变性风险的受试者的方法，该方法包括检测获自受试者的样品中外泌体结合的聚集生物标志物的水平，其中与参照相比，外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明受试者患有神经变性疾病或淀粉样变性。

[0275] 在另一个方面，本文描述了一种检测和治疗受试者神经变性疾病或淀粉样变性的方法，该方法包括：a)检测获自受试者的样品中外泌体结合的聚集生物标志物的水平，其中与参照相比，外泌体结合的聚集生物标志物的水平增加表明受试者患有神经变性疾病或淀粉样变性；b)治疗患有神经变性疾病或淀粉样变性的受试者。

[0276] 在另一个方面，本文描述了一种确定样品中生物标志物的聚集状态的方法，该方法包括检测样品中外泌体结合的生物标志物的水平，其中与参照相比，外泌体结合的生物标志物的水平表明生物标志物的聚集程度。

[0277] 在一些实施方案中，该方法包括在检测外泌体结合的生物标志物水平的步骤之前使样品与外泌体群接触的步骤。

[0278] 在一些实施方案中，与非聚集生物标志物相比，样品中聚集的生物标志物优先结合外泌体。

[0279] 在一些实施方案中，样品是从受试者获得的。

[0280] 在一些实施方案中，与参照相比，生物标志物的聚集程度增加表明受试者患有神经变性疾病或淀粉样变性。

[0281] 在一些实施方案中，该方法包括治疗患有神经变性疾病或淀粉样变性的受试者。

[0282] 在一些实施方案中，治疗包括向受试者施用治疗有效量的一种或多种药物或它们的组合。

[0283] 在一些实施方案中，药物选自胆碱酯酶抑制剂、NMDA受体拮抗剂、胆碱酯酶抑制剂和NMDA受体拮抗剂的组合、BACE1抑制剂、抗体、蛋白质聚集抑制剂、蛋白酶体抑制剂、小分子、基因疗法、抗tau蛋白药物或它们的组合。

[0284] 在一些实施方案中，胆碱酯酶抑制剂是多奈哌齐、利伐斯的明或加兰他敏；NMDA受体拮抗剂是美金刚；BACE1抑制剂是AZD3293；抗体是阿杜卡奴单抗；和/或抗tau药物是TRx0237(LMTX)。

[0285] 在一些实施方案中，药物选自氯化甲硫鎓、无色甲硫鎓双(氢甲磺酸盐)、姜黄素、酸性品红、表没食子儿茶素没食子酸酯、番红花醛、刚果红、芹菜素、天蓝C、碱性蓝41、(反式,反式)-1-溴-2,5-双-(3-羟基羰基-4-羟基)苯乙烯基苯(BSB)、芝加哥天蓝6B、-环糊精、盐酸道诺霉素、二甲基黄、直接红80、2,2-二羟基二苯甲酮、十六烷基三甲基溴化铵(C16)、氯化血红素、血红素、吲哚美辛、胡桃酮、间苯二酚蓝、磺基水杨酸甲氯黄素、褪黑激素、杨梅素、1,2-萘醌、去甲二氢愈创木酸、R()-去甲吗啡氢溴酸盐、橙G、邻香兰素(2-羟基-3-甲氧基苯甲醛)、吩嗪、酞菁、利福霉素SV、苯酚红、氢吡四环素、奎纳克林芥末二盐酸盐、硫代黄素S、ThT和三甲基(十四烷基)溴化铵(C17)、二烯丙基酒石、伊红Y、非诺贝特、新铜碱、制霉菌素、十八烷基硫酸盐和/或罗丹明B。

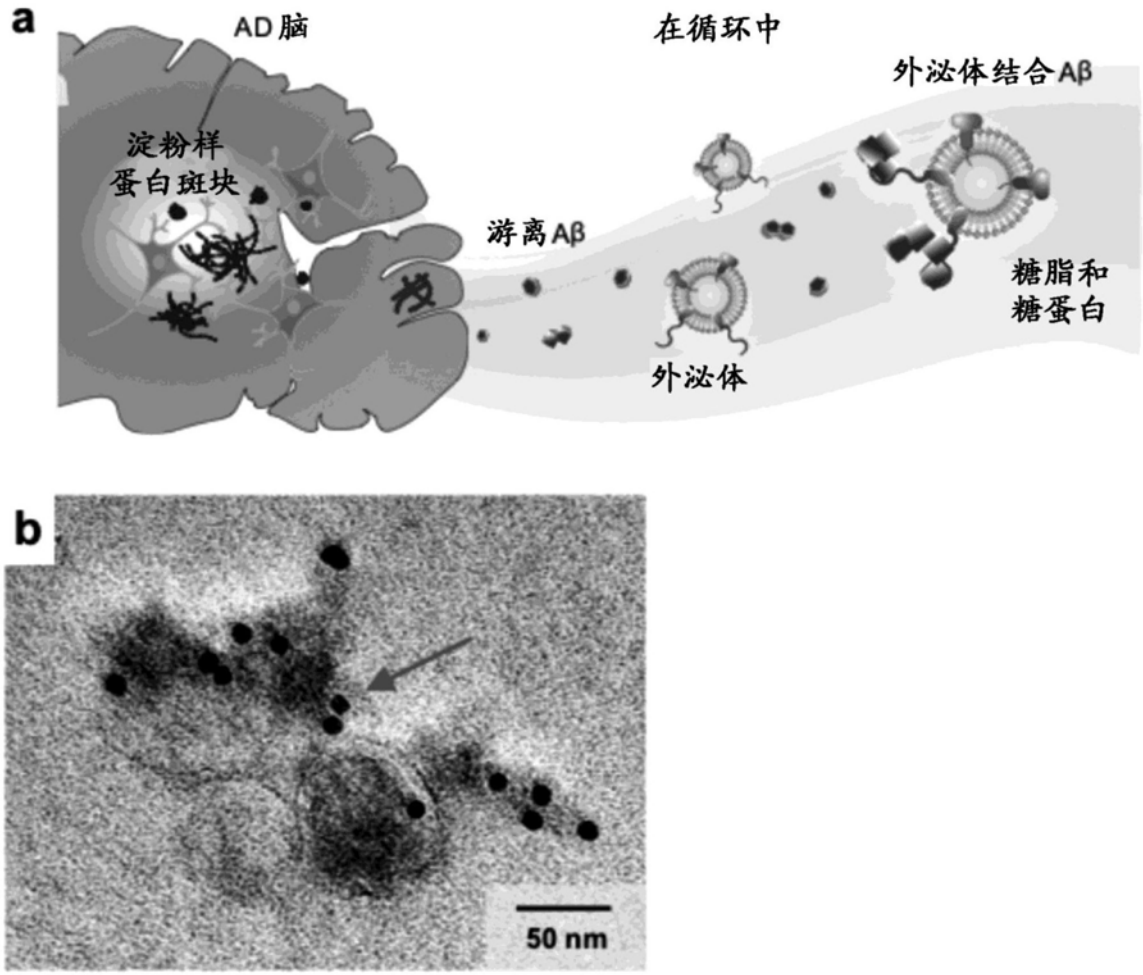


图1(a)-(b)(待续)

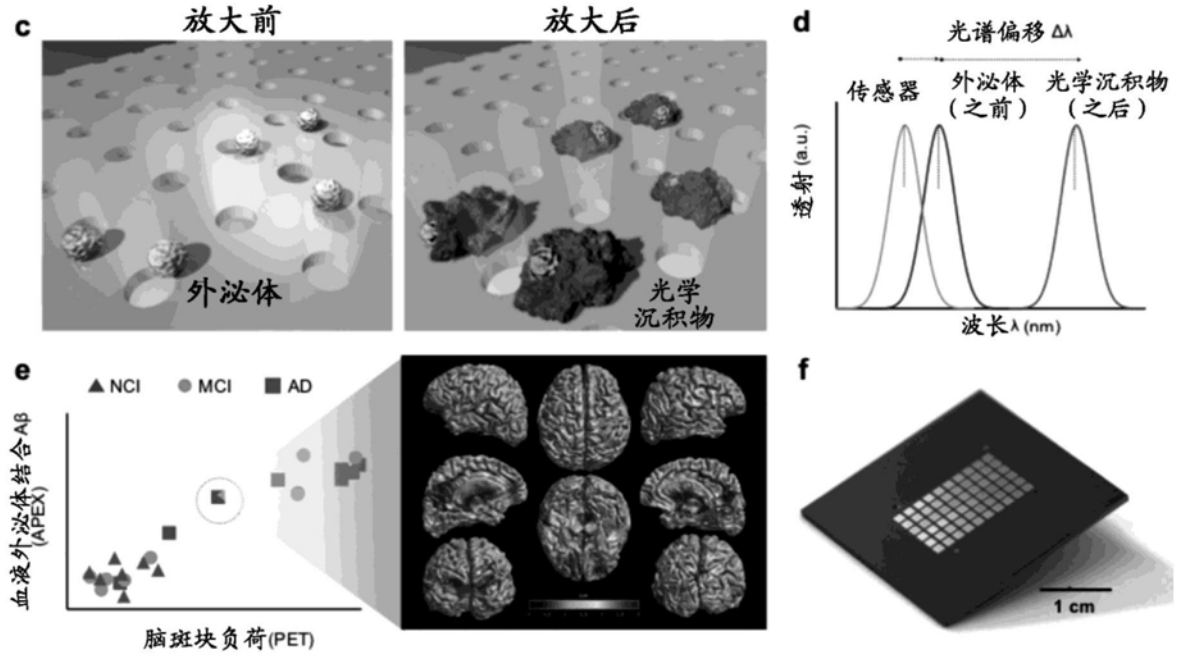

c
放大前
放大后
外泌体
光学
沉积物
d
光谱偏移 Δλ
传感器
外泌体
（之前）
光学沉积物
（之后）
透射(a.u.)
波长λ(nm)
e
NCI
MCI
AD
血液外泌体结合Aβ
(APEX)
脑斑块负荷(PET)
f
1 cm

图1(c)-(f)(完)

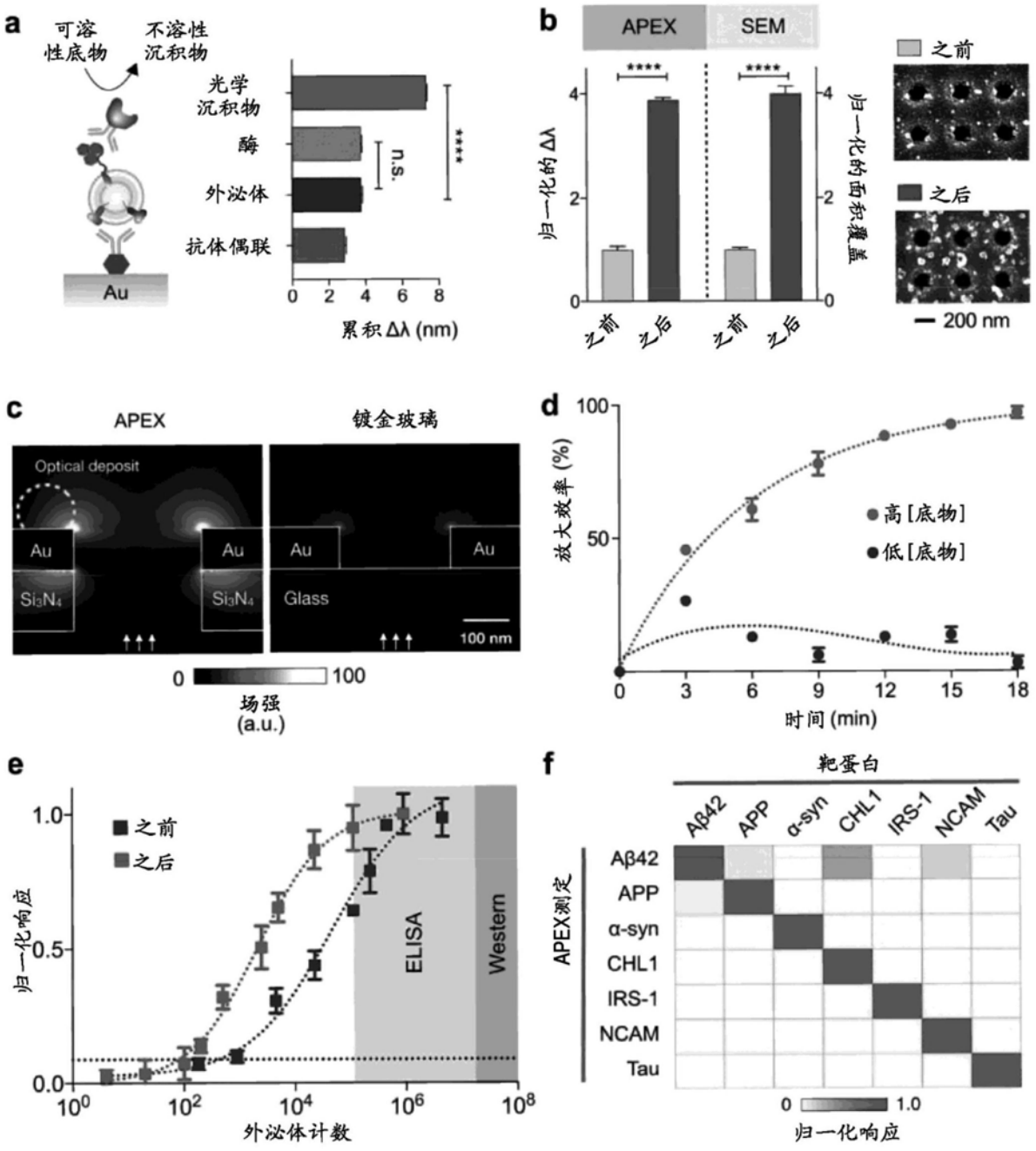

a
可溶性底物
不溶性沉积物
光学沉积物
酶
外泌体
抗体偶联
Au
n.s.
****
0 2 4 6 8
累积Δλ (nm)
b
APEX
SEM
****
****
归一化的Δλ
归一化的面积覆盖
之前
之后
之前
之后
之前
之后
200 nm
c
APEX
镀金玻璃
Optical deposit
Au
Si3N4
Glass
100 nm
0
100
场强
(a.u.)
d
放大效率 (%)
高[底物]
低[底物]
时间 (min)
e
之前
之后
归一化响应
ELISA
Western
外泌体计数
f
靶蛋白
Aβ42
APP
α-syn
CHL1
IRS-1
NCAM
Tau
APEX测定
0
1.0
归一化响应

图2

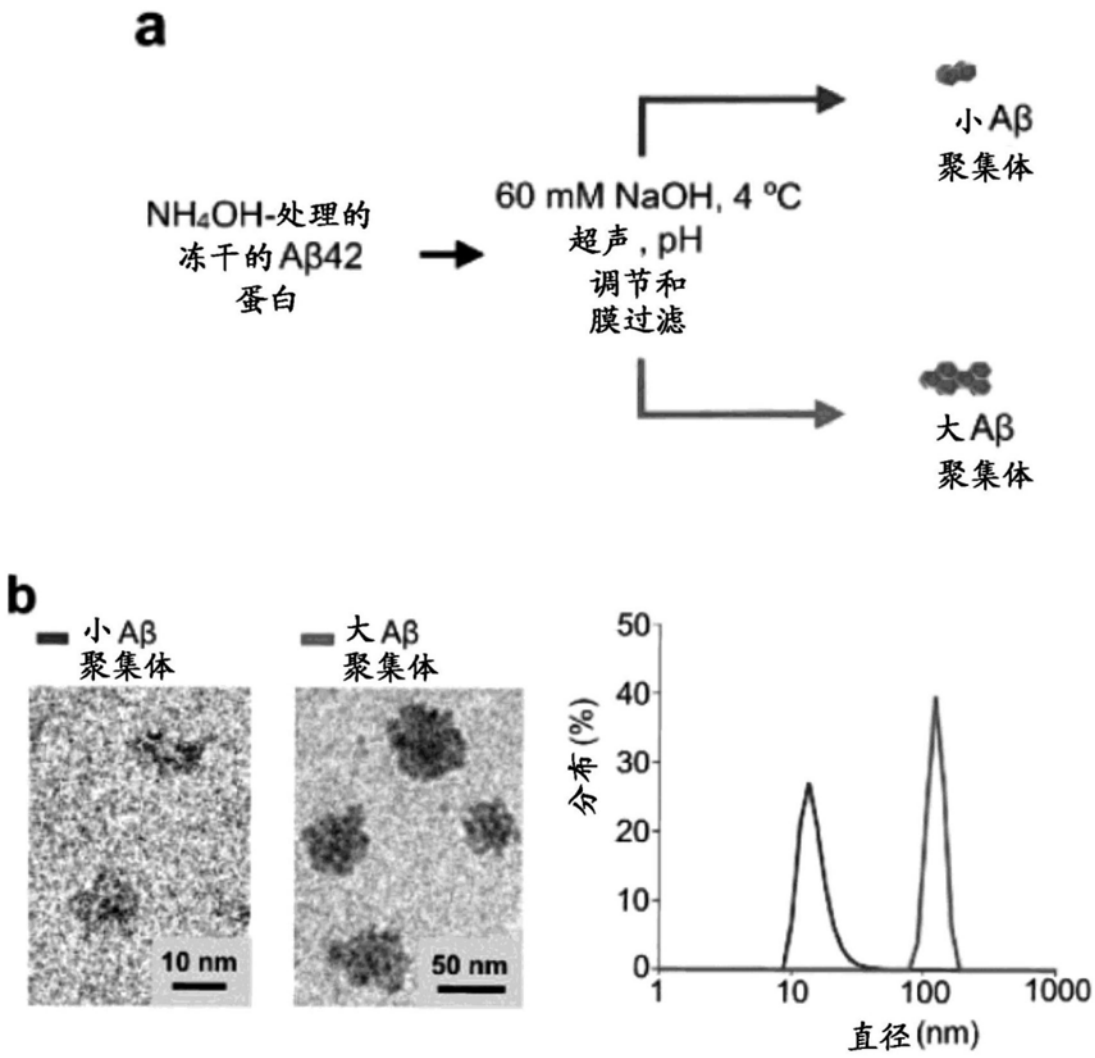
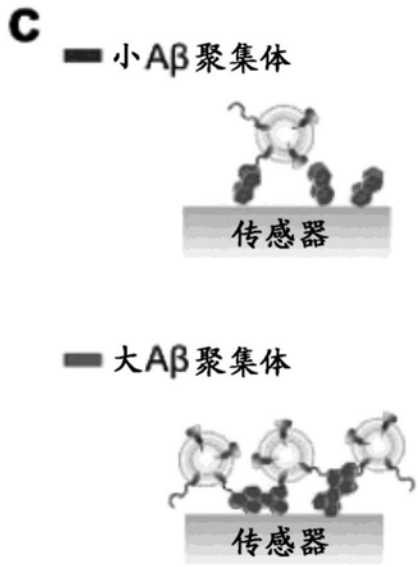

a
NH4OH-处理的
冻干的Aβ42
蛋白
60 mM NaOH, 4 ℃
超声，pH
调节和
膜过滤
小Aβ
聚集体
大Aβ
聚集体
b
小Aβ
聚集体
大Aβ
聚集体
10 nm
50 nm
分布(%)
50
40
30
20
10
0
1
10
100
1000
直径(nm)

图3(a)-(b)(待续)


c
小Aβ聚集体
传感器
大Aβ聚集体
传感器

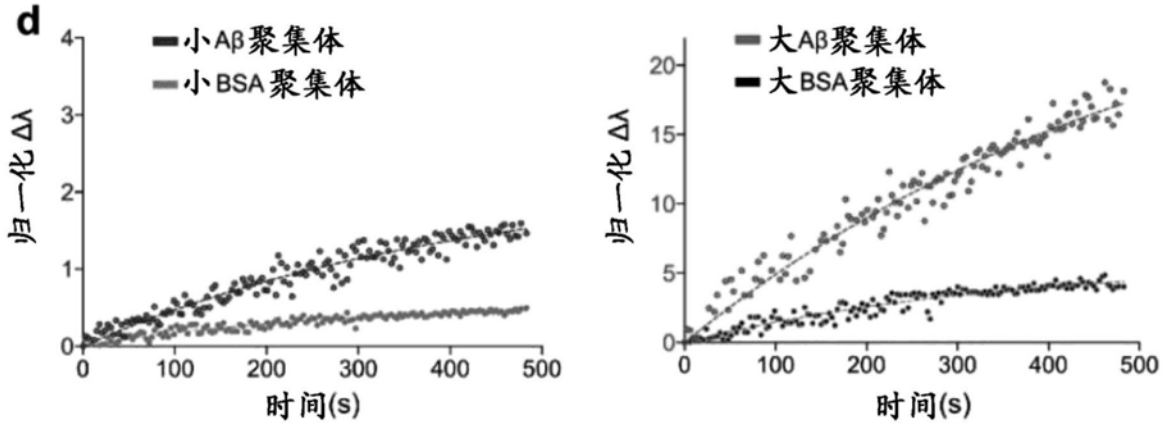

d
小Aβ聚集体
小BSA聚集体
归一化 Δλ
时间(s)
大Aβ聚集体
大BSA聚集体
归一化 Δλ
时间(s)

图3(c)-(d)(待续)

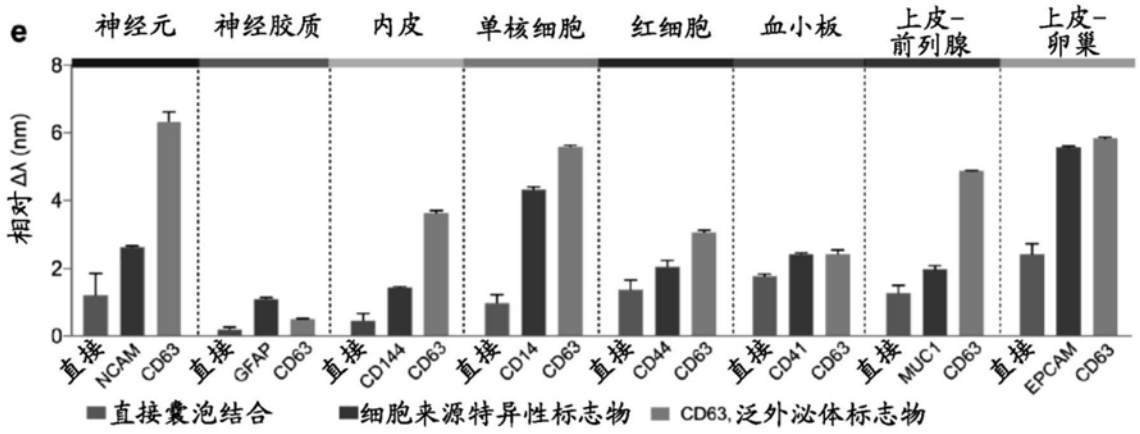

e
神经元
神经胶质
内皮
单核细胞
红细胞
血小板
上皮-前列腺
上皮-卵巢
相对 Δλ (nm)
直接 NCAM CD63
直接 GFAP CD63
直接 CD144 CD63
直接 CD14 CD63
直接 CD44 CD63
直接 CD41 CD63
直接 MUC1 CD63
直接 EPCAM CD63
直接囊泡结合
细胞来源特异性标志物
CD63,泛外泌体标志物

图3(e)(完)

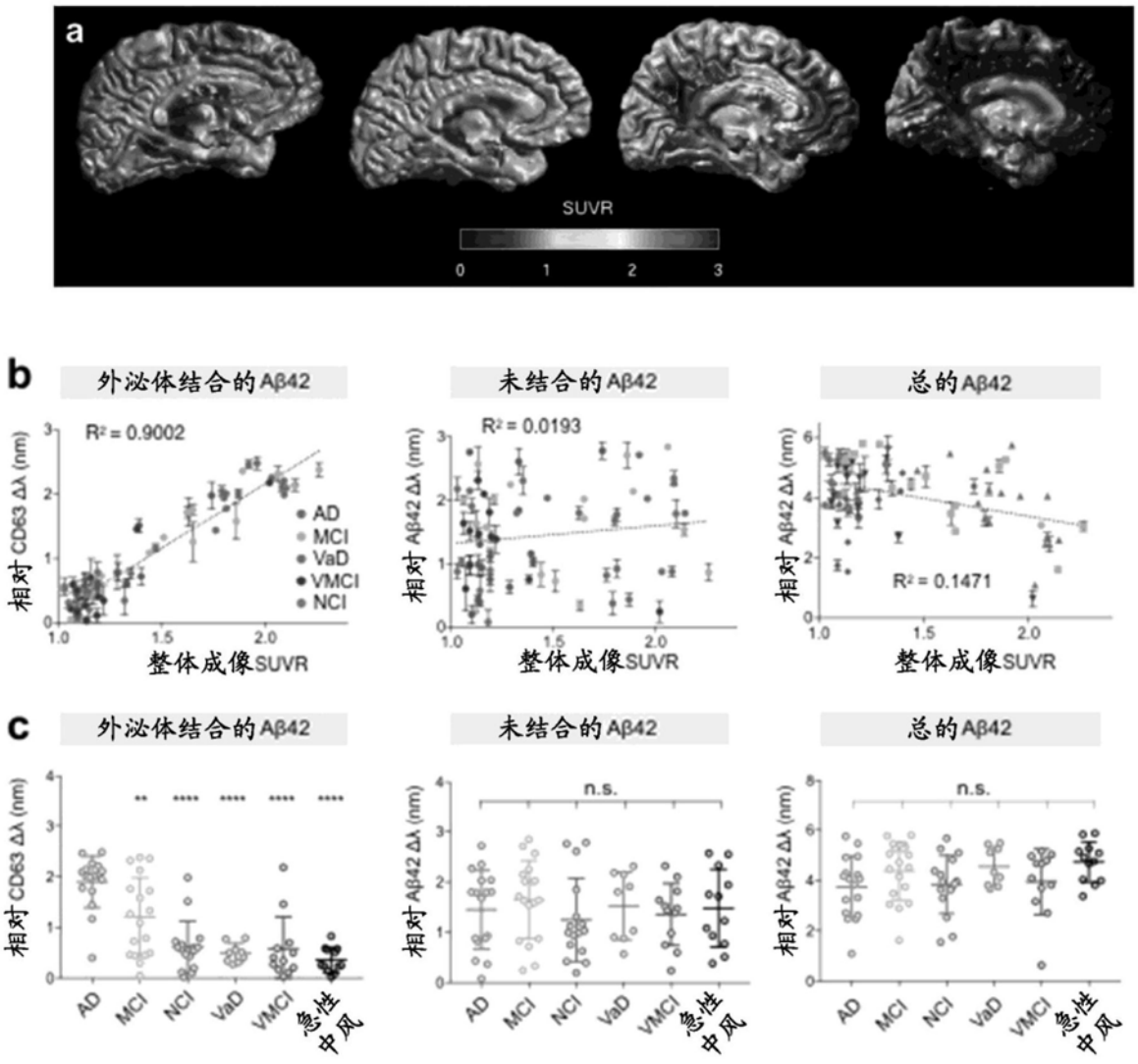

a
SUVR
0
1
2
3
b
外泌体结合的Aβ42
未结合的Aβ42
总的Aβ42
R² = 0.9002
R² = 0.0193
R² = 0.1471
相对 CD63 Δλ (nm)
相对 Aβ42 Δλ (nm)
AD
MCI
VaD
VMCI
NCI
整体成像SUVR
c
外泌体结合的Aβ42
未结合的Aβ42
总的Aβ42
n.s.
AD
MCI
NCI
VaD
VMCI
急性中风

图4

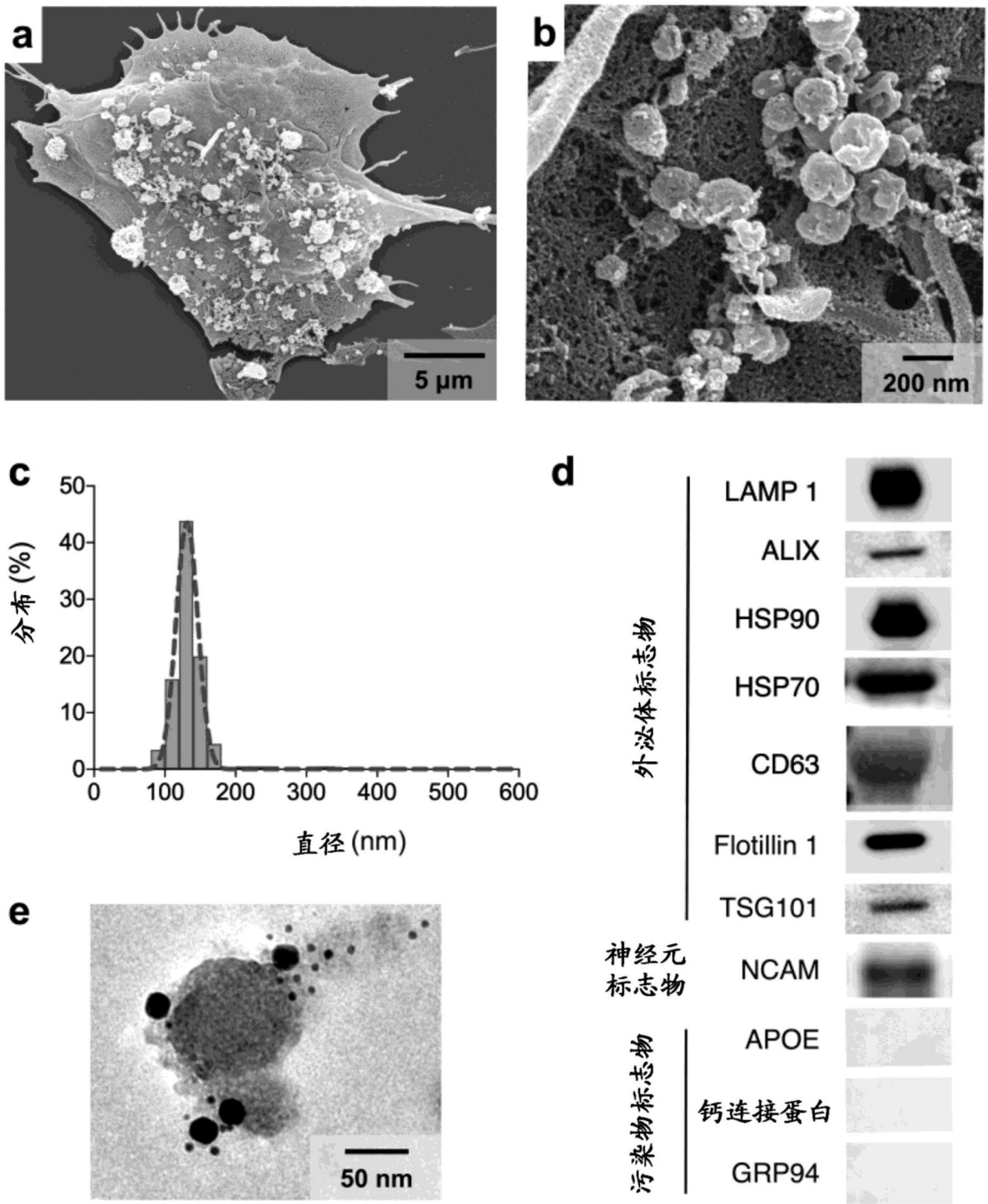

a
5 μm
b
200 nm
c
分布 (%)
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300
400
500
600
直径 (nm)
d
外泌体标志物
LAMP 1
ALIX
HSP90
HSP70
CD63
Flotillin 1
TSG101
神经元标志物
NCAM
污染物标志物
APOE
钙连接蛋白
GRP94
e
50 nm

图5

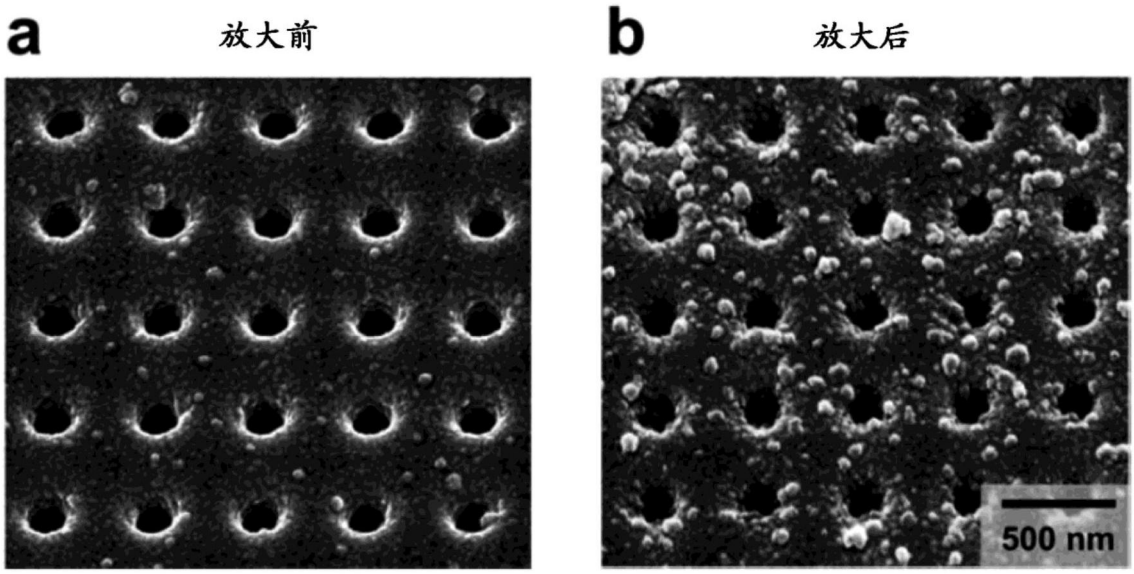

a
放大前
b
放大后
500 nm

图6

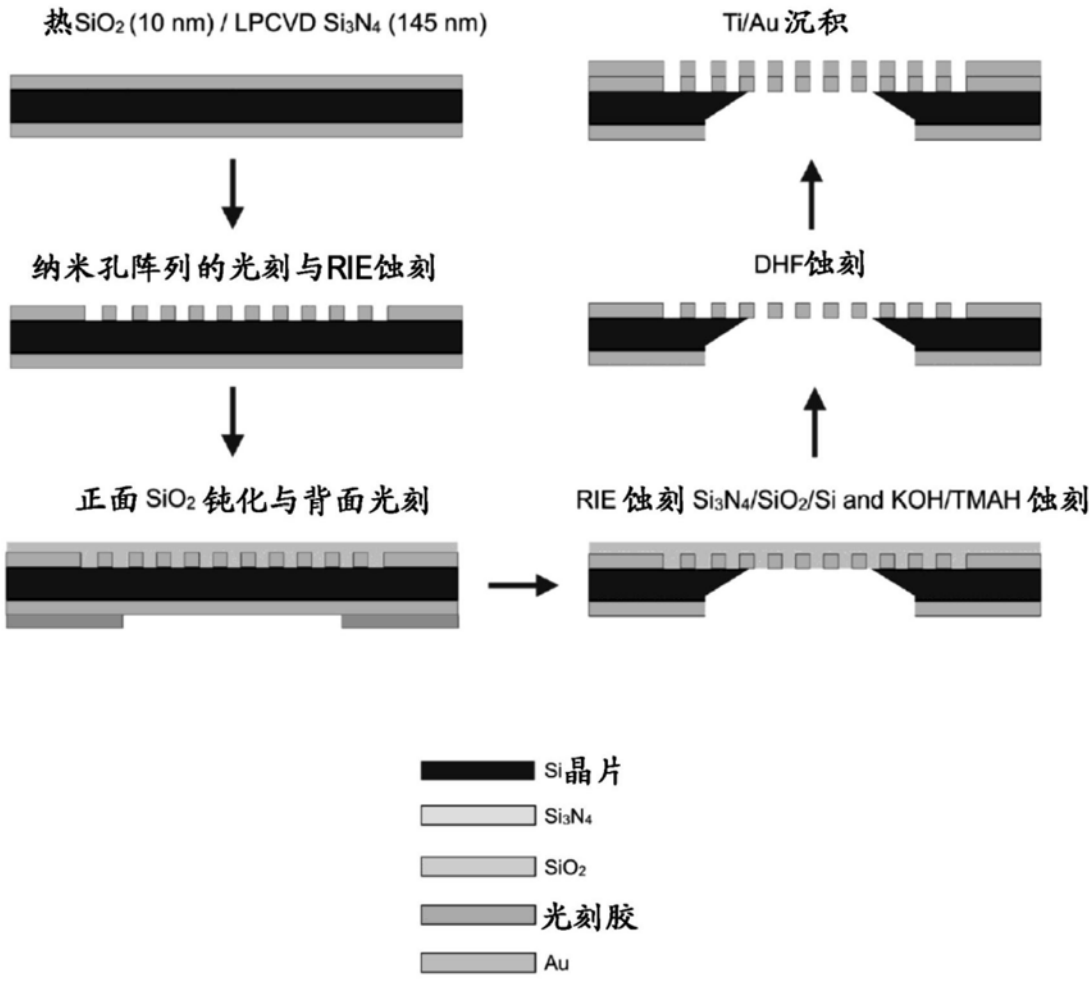

热SiO2 (10 nm) / LPCVD Si3N4 (145 nm)
纳米孔阵列的光刻与RIE蚀刻
正面 SiO2 钝化与背面光刻
Ti/Au 沉积
DHF蚀刻
RIE 蚀刻 Si3N4/SiO2/Si and KOH/TMAH 蚀刻
Si晶片
Si3N4
SiO2
光刻胶
Au

图7

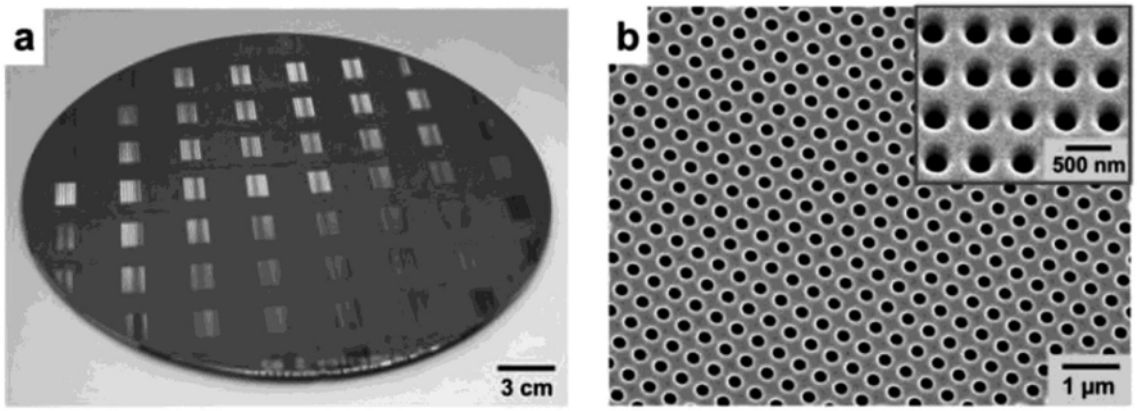

a
3 cm
b
500 nm
1 μm

图8

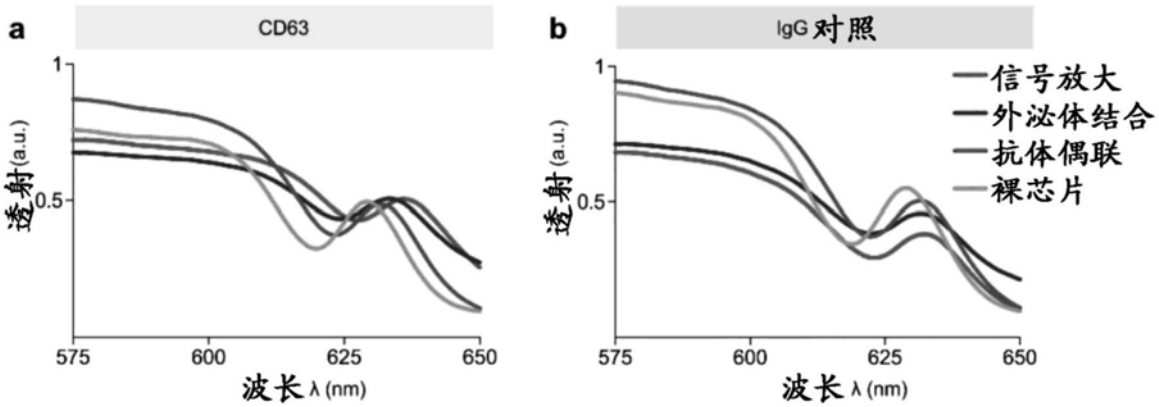

a
CD63
b
IgG 对照
透射(a.u.)
1
0.5
575
600
625
650
波长 λ (nm)
信号放大
外泌体结合
抗体偶联
裸芯片

图9

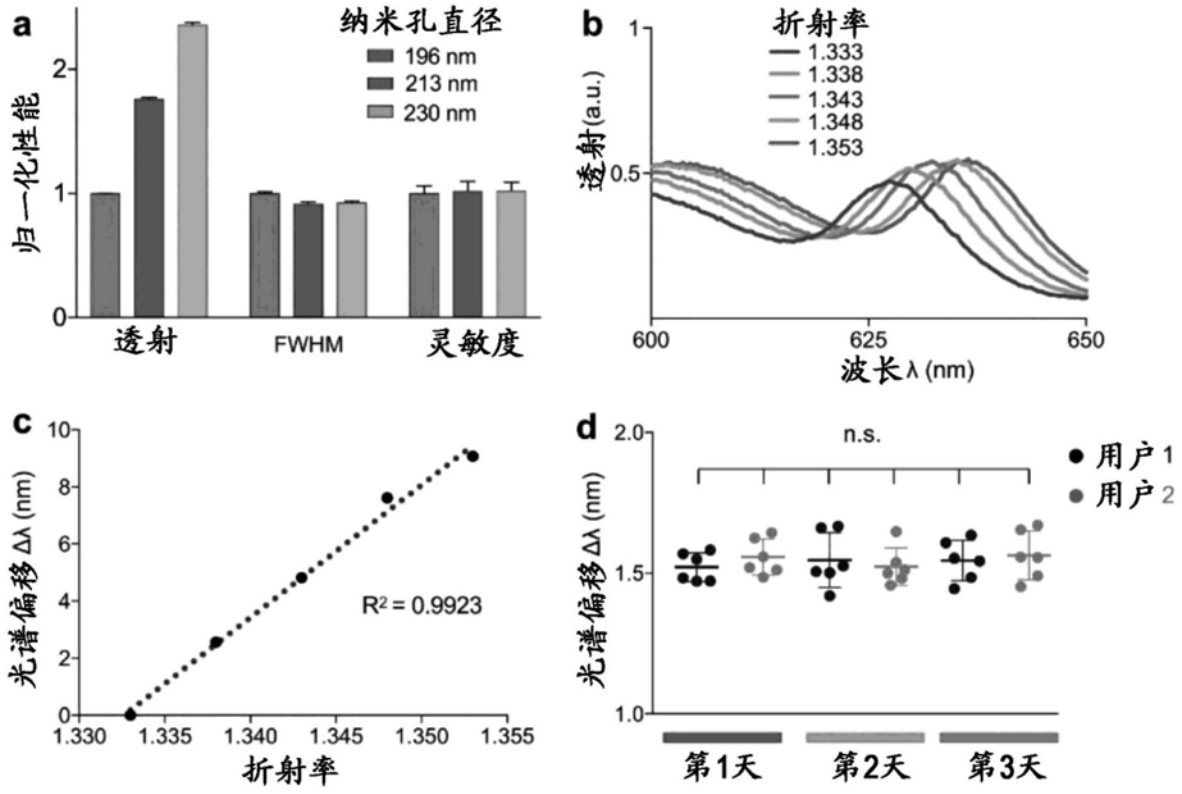
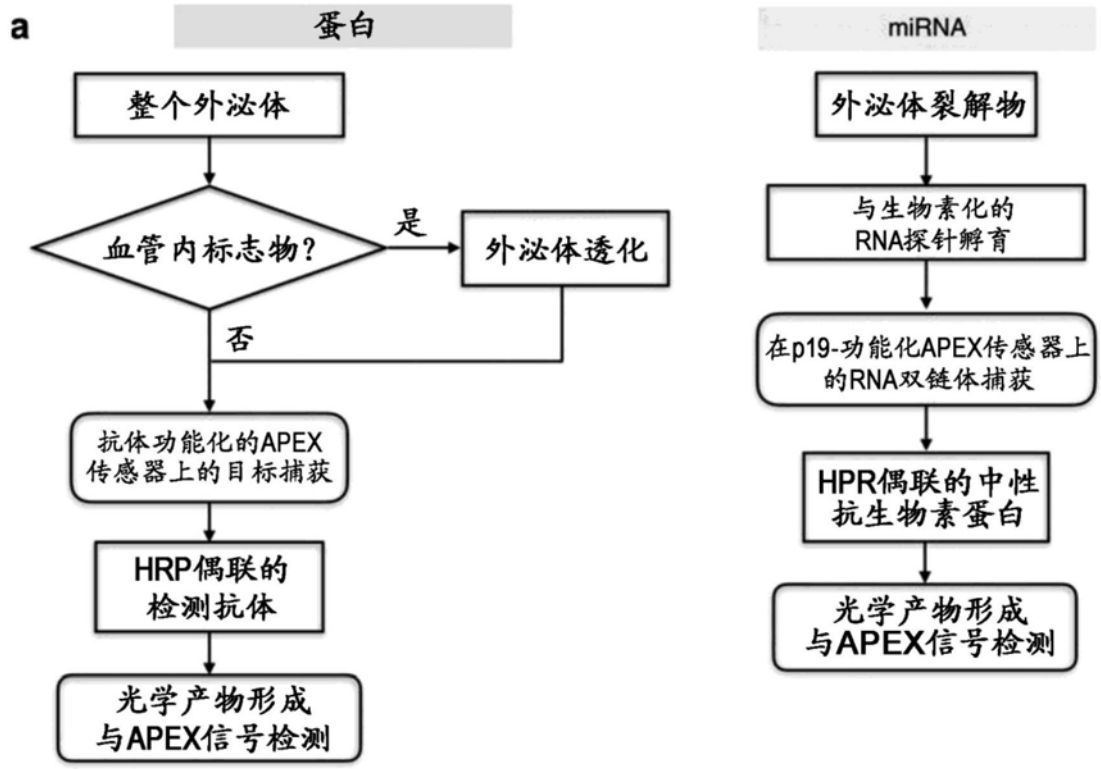

a
纳米孔直径
196 nm
213 nm
230 nm
归一化性能
透射
FWHM
灵敏度
b
折射率
1.333
1.338
1.343
1.348
1.353
透射(a.u.)
波长λ (nm)
c
光谱偏移 Δλ (nm)
R² = 0.9923
折射率
d
n.s.
用户 1
用户 2
光谱偏移 Δλ (nm)
第1天
第2天
第3天

图10


a
蛋白
整个外泌体
血管内标志物?
是
外泌体透化
否
抗体功能化的APEX
传感器上的目标捕获
HRP偶联的
检测抗体
光学产物形成
与APEX信号检测
miRNA
外泌体裂解物
与生物素化的
RNA探针孵育
在p19-功能化APEX传感器上
的RNA双链体捕获
HPR偶联的中性
抗生物素蛋白
光学产物形成
与APEX信号检测

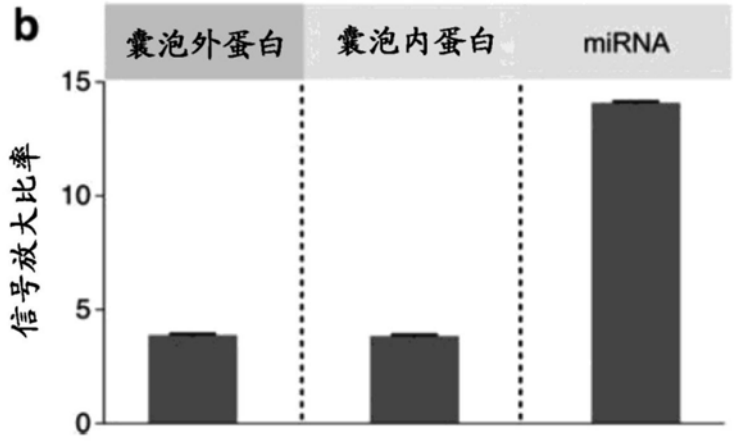

b
囊泡外蛋白
囊泡内蛋白
miRNA
信号放大比率
15
10
5
0

图11

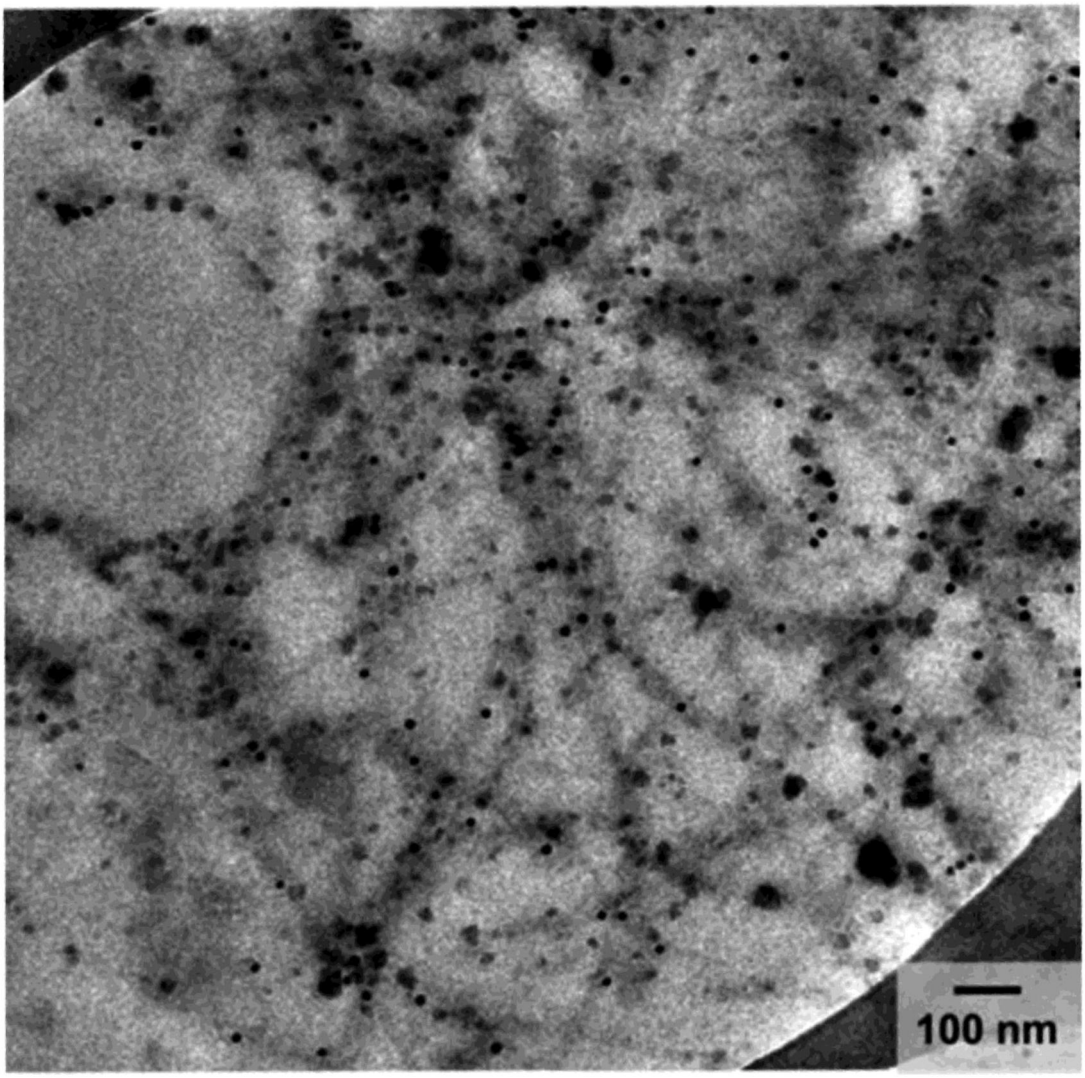


图12

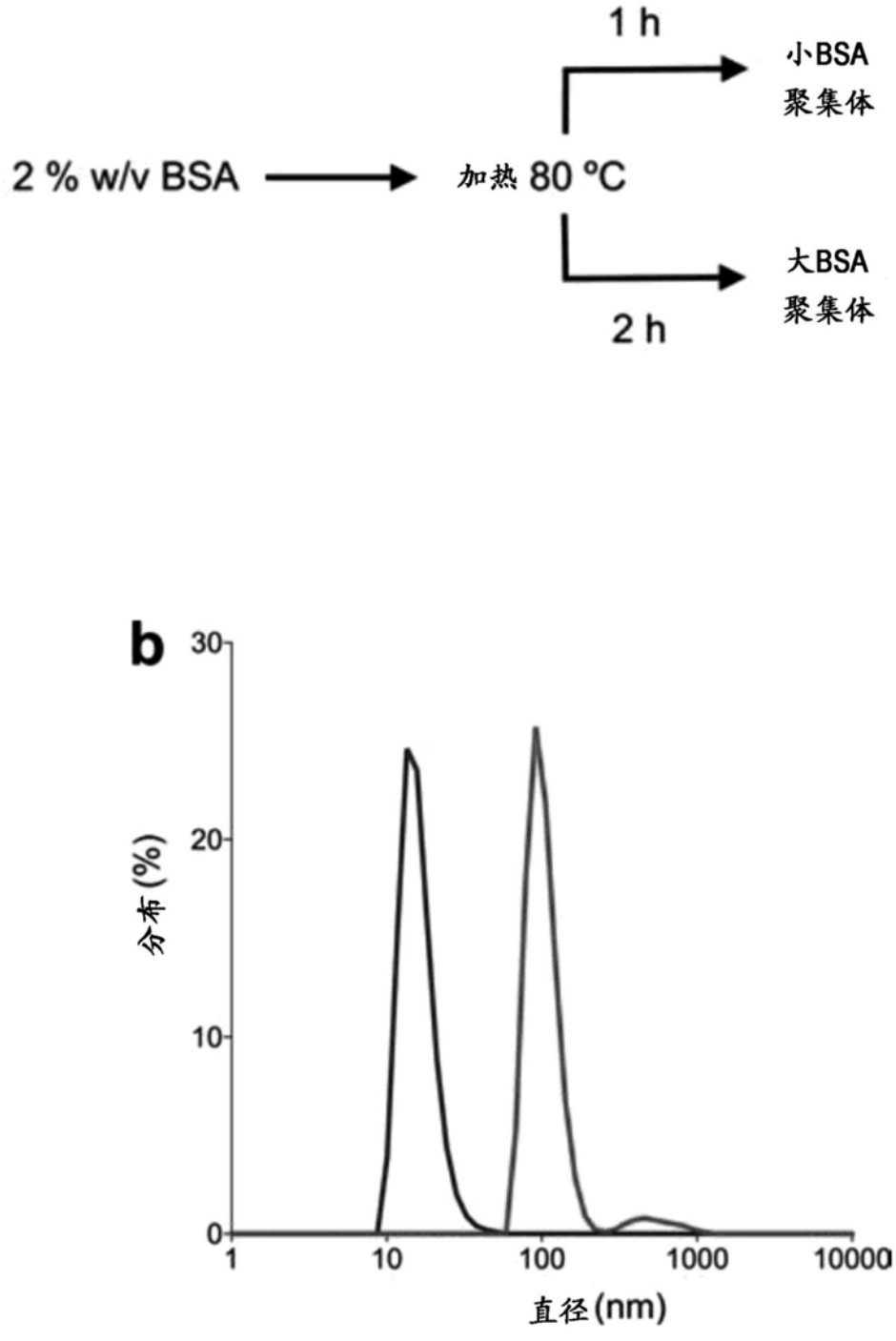

a
1 h
小BSA
聚集体
2 % w/v BSA
加热 80 ℃
大BSA
聚集体
2 h
b
30
20
10
0
分布(%)
1
10
100
1000
10000
直径(nm)

图13

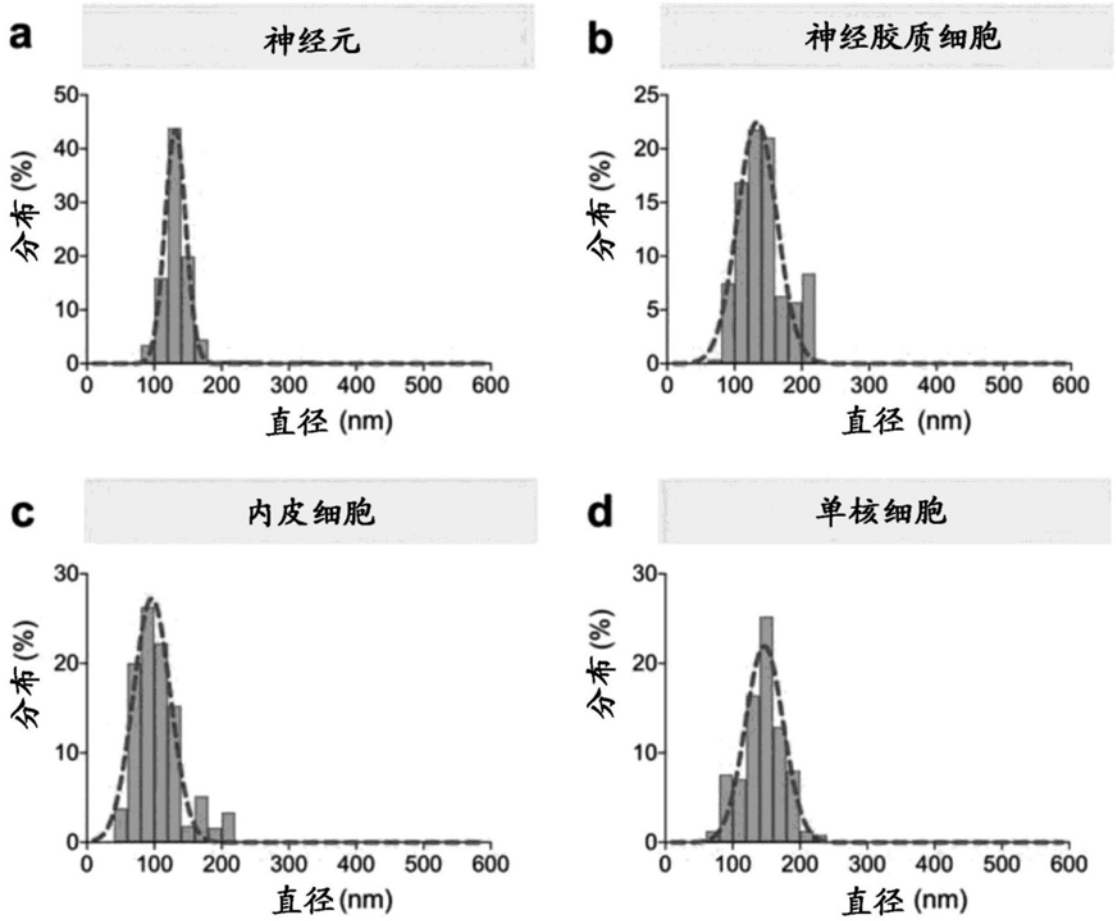


图14 (a) - (d) (待续)

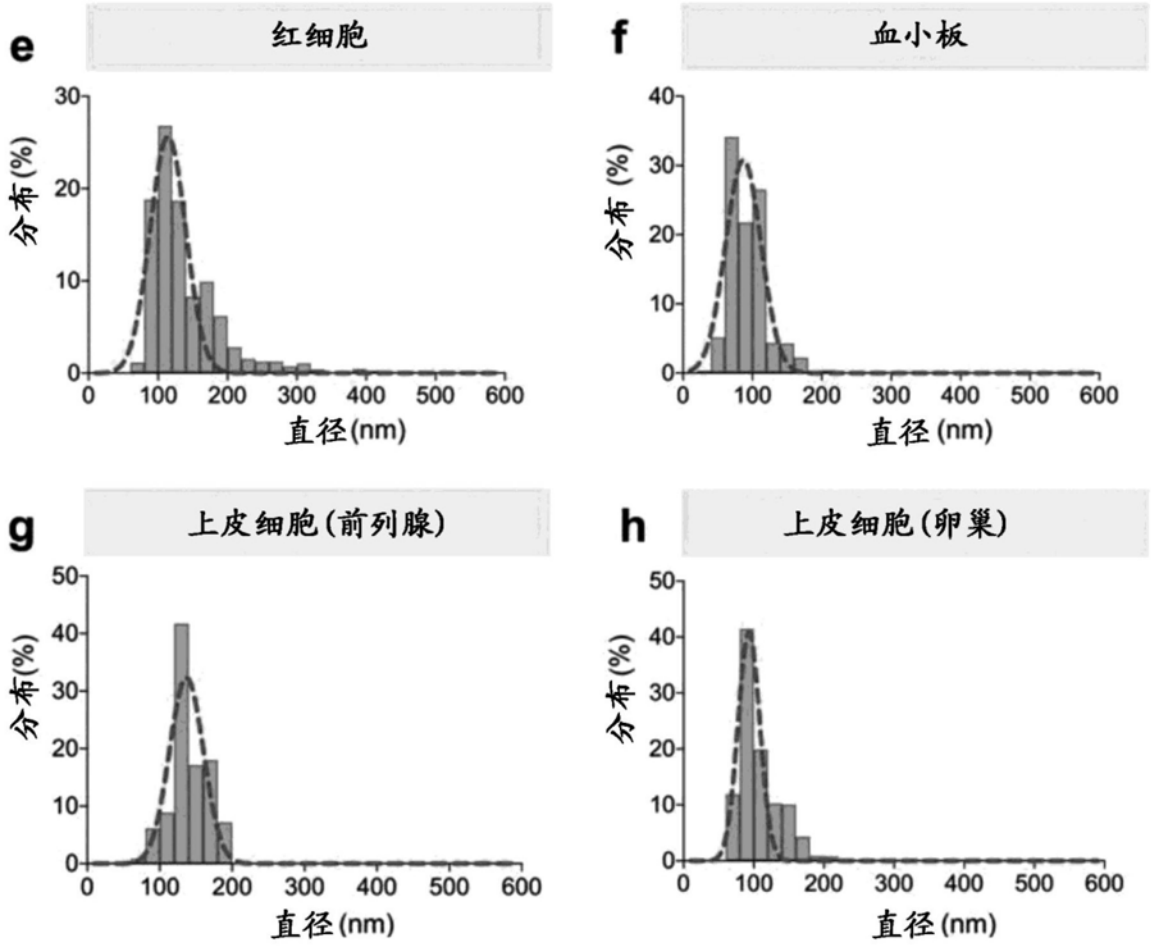


图14(e)-(h)(完)

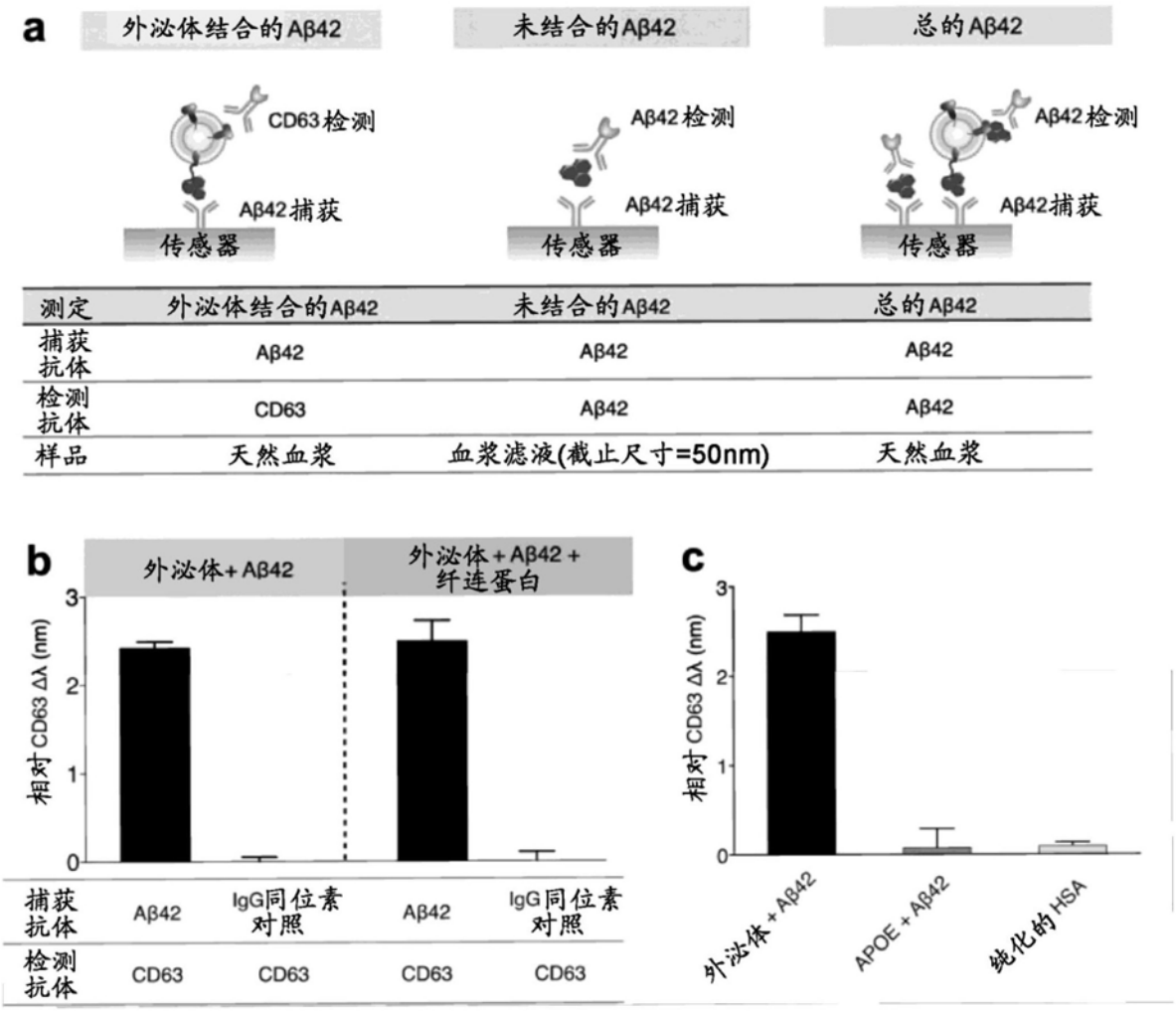

a
外泌体结合的Aβ42
未结合的Aβ42
总的Aβ42
CD63检测
Aβ42捕获
传感器
Aβ42检测
Aβ42捕获
传感器
Aβ42检测
Aβ42捕获
传感器
测定 外泌体结合的Aβ42 未结合的Aβ42 总的Aβ42
捕获抗体 Aβ42 Aβ42 Aβ42
检测抗体 CD63 Aβ42 Aβ42
样品 天然血浆 血浆滤液(截止尺寸=50nm) 天然血浆
b
外泌体+Aβ42
外泌体+Aβ42+纤连蛋白
相对CD63 Δλ (nm)
0
1
2
3
捕获抗体 Aβ42 IgG同位素对照 Aβ42 IgG同位素对照
检测抗体 CD63 CD63 CD63 CD63
c
相对CD63 Δλ (nm)
0
1
2
3
外泌体+Aβ42
APOE+Aβ42
纯化的HSA

图15

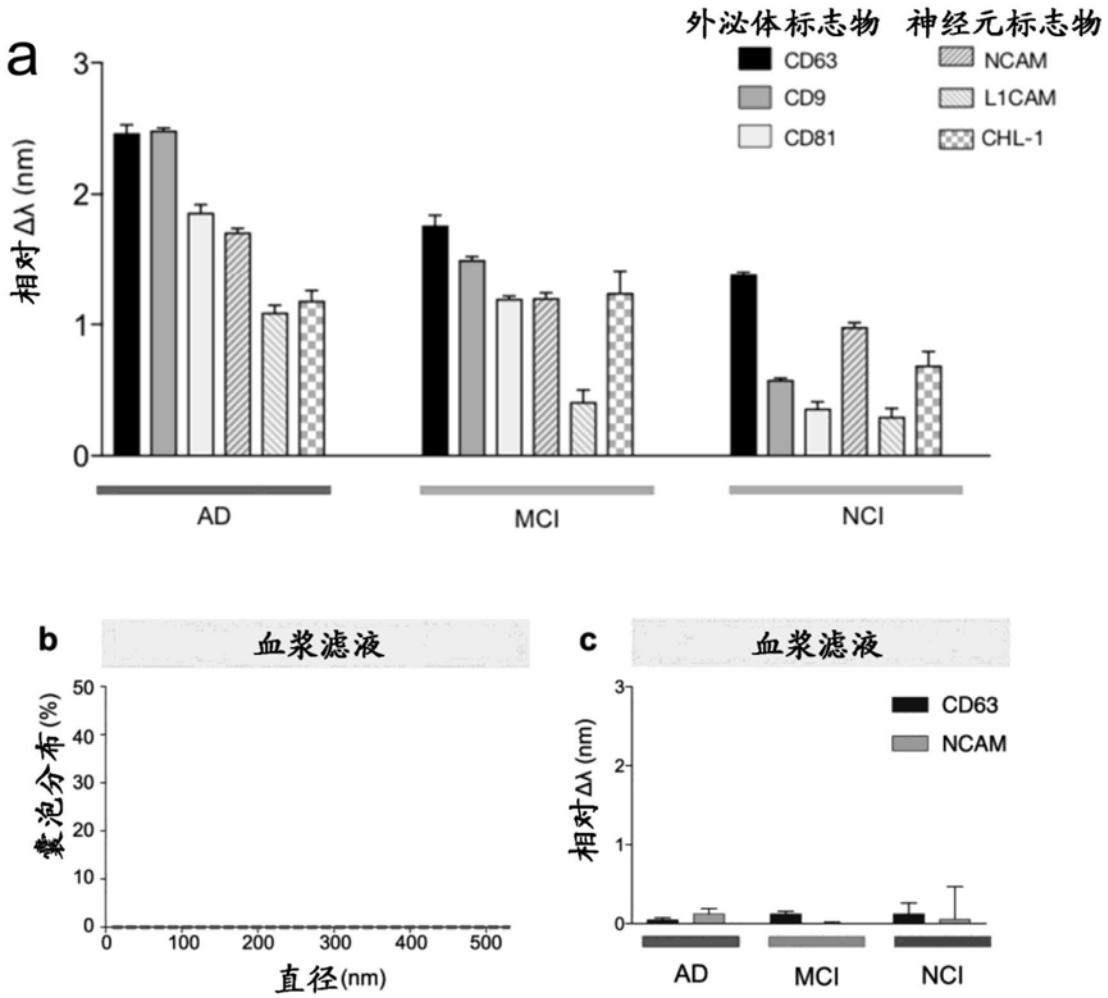

a
外泌体标志物
神经元标志物
CD63
CD9
CD81
NCAM
L1CAM
CHL-1
相对Δλ (nm)
AD
MCI
NCI
b
血浆滤液
囊泡分布 (%)
直径(nm)
c
血浆滤液
CD63
NCAM
相对Δλ (nm)
AD
MCI
NCI

图16

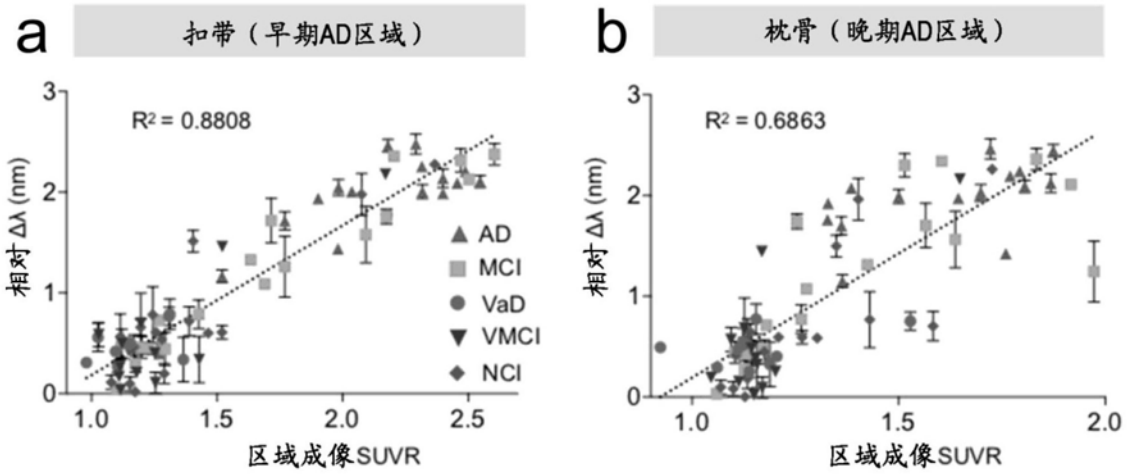

a
扣带（早期AD区域）
R² = 0.8808
相对 Δλ (nm)
AD
MCI
VaD
VMCI
NCI
区域成像SUVR
b
枕骨（晚期AD区域）
R² = 0.6863
相对 Δλ (nm)
区域成像SUVR

图17

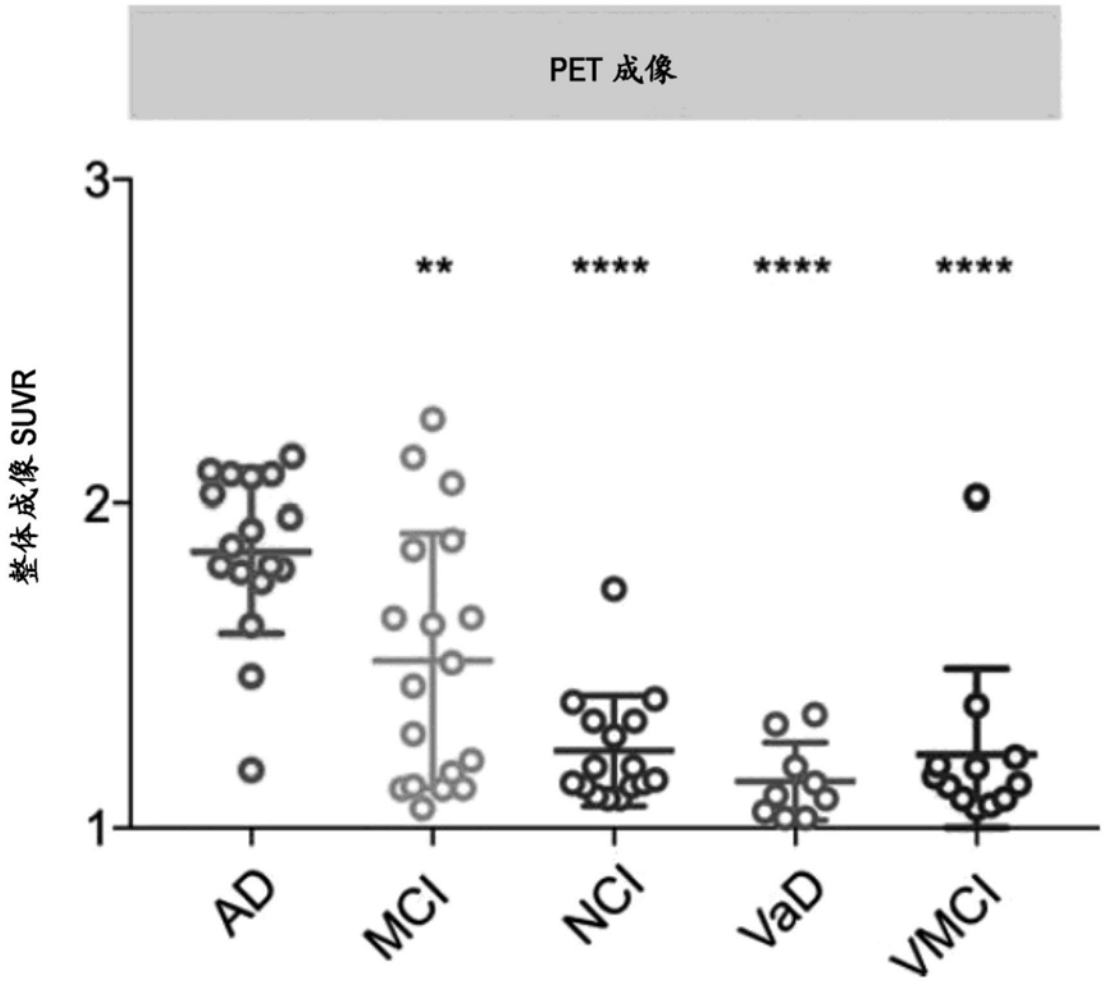


图18

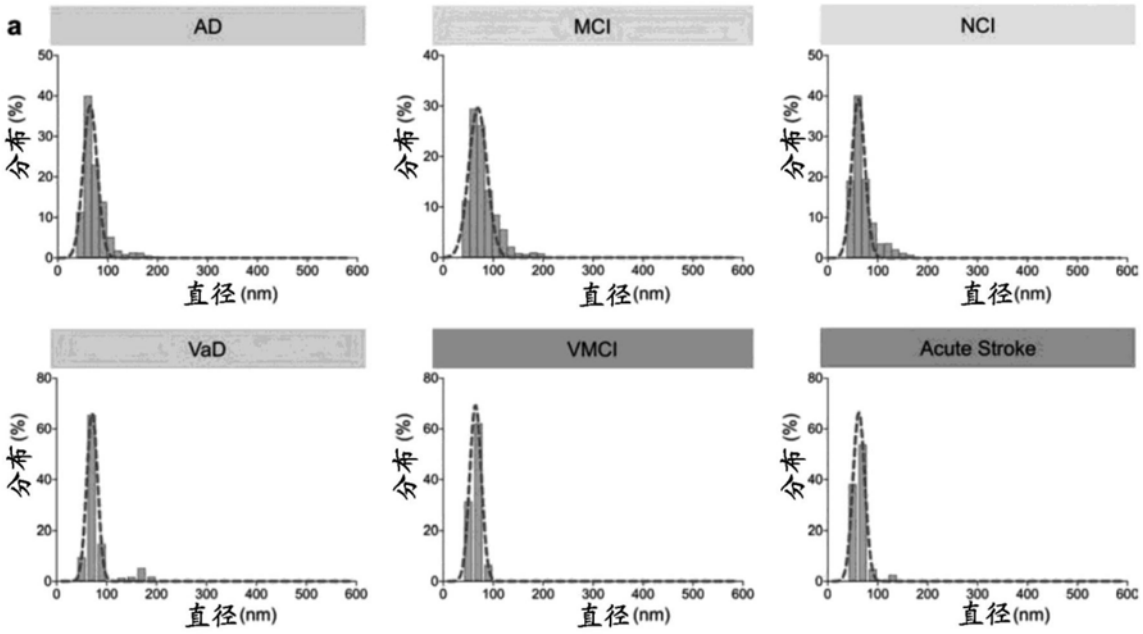


图19(a)(待续)

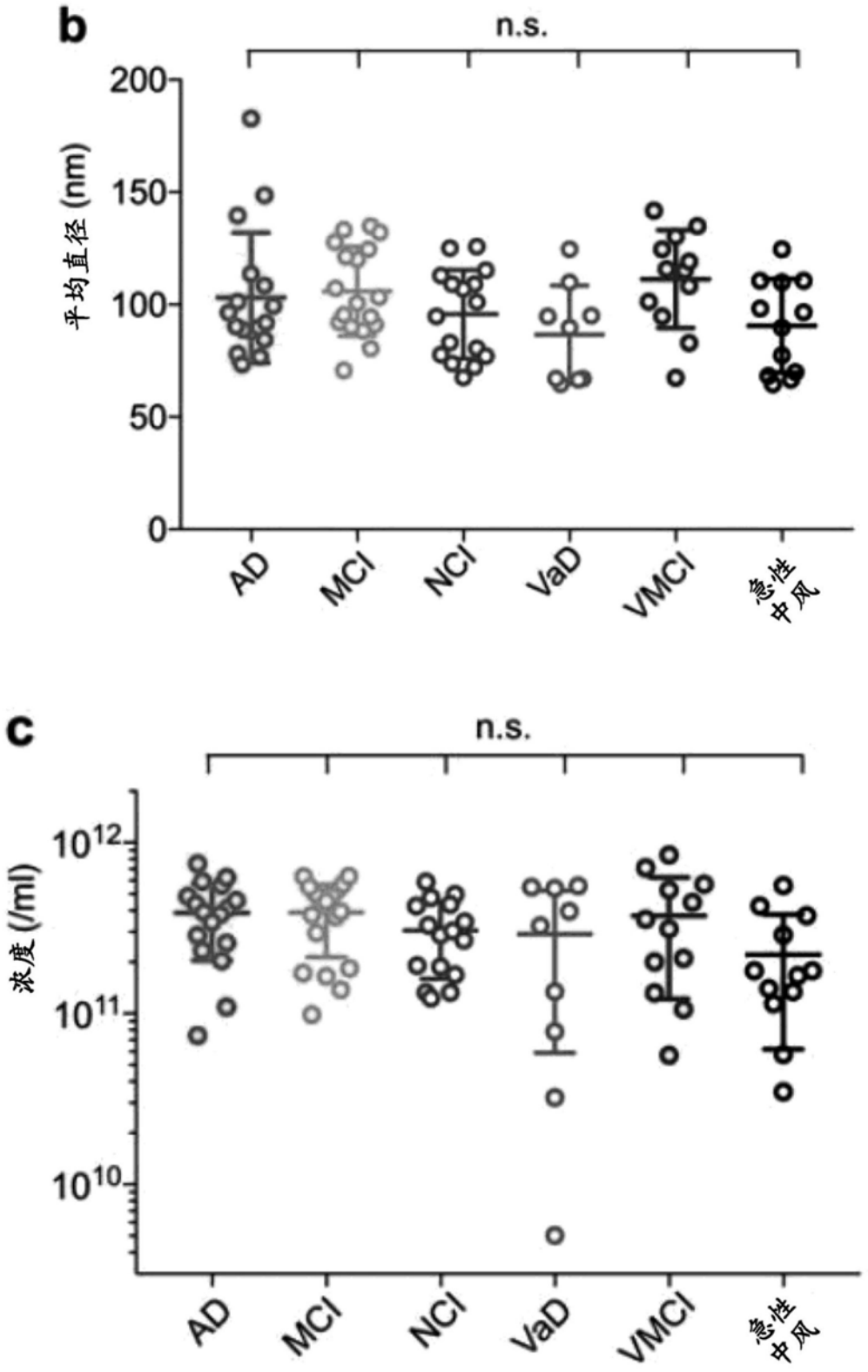
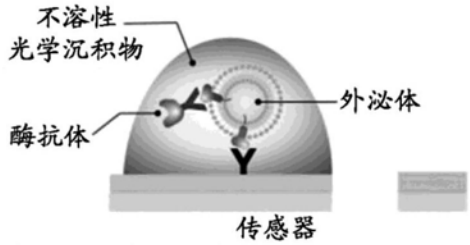
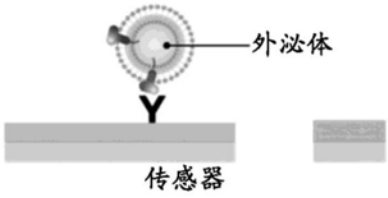
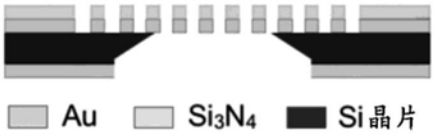
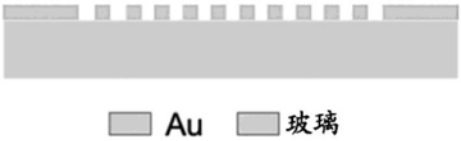

b
n.s.
平均直径 (nm)
200
150
100
50
0
AD
MCI
NCI
VaD
VMCI
急性中风
c
n.s.
浓度 (/ml)
10^{12}
10^{11}
10^{10}
AD
MCI
NCI
VaD
VMCI
急性中风

图19(b)-(c)(完)

	APEX	其它 SPR 平台
测定技术	 • 免疫捕获外泌体并将定位的、不溶性光学产物酶促沉积在传感器结合的外泌体上 • 仅当多个靶点在外泌体中共定位时，不溶性沉积物才形成 • 不溶性沉积物改变折射率，并放大SPR检测信号 • 检测限~200个外泌体	 • 免疫捕获外泌体并通过外泌体诱导的折射率的改变进行检测 • 检测限~3000个外泌体
可能的靶点	• 检测不同的外泌体蛋白（囊泡外和囊泡内）和RNA靶点 • 检测外泌体靶点共定位（例如，Aβ42+ CD63+）	• 检测外泌体囊泡外蛋白 • 不能检测靶点共定位
设备设计	 • 悬浮在图案化的氮化硅（Si_3N_4）膜上的金（Au）纳米孔 • 双层纳米结构	 • 均匀玻璃衬底上的金（Au）纳米孔 • 镀金玻璃

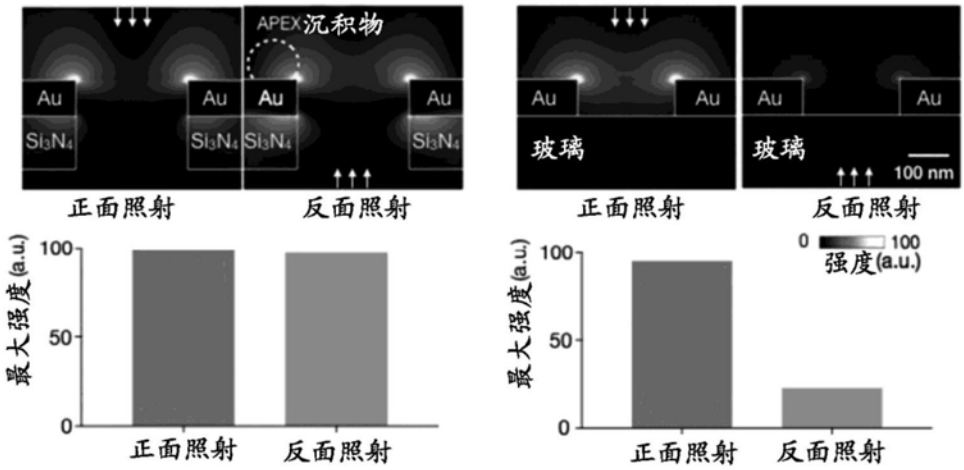
光学性能		
光学性能	• APEX设计实现双向光激发，可能由于在耦合的双层等离子体结构中的Fano共振（即在Au和Si_3N_4层中的周期性纳米孔） • 可以通过正面照射（从Au侧的光照射）或背面照射（从Si_3N_4侧）激发SPR，且在两种情况下可以检测到等强的透射光强度 • 背面照射使对酶促APEX放大的直接入射光最小化（在Au侧沉积）并提高分析稳定性	• 镀金玻璃纳米孔设计仅支持正面照射（从Au侧的光照）
制造	深紫外光刻技术 • 用于精确纳米孔图案化转移的先进的平行处理 • 大的晶片级制造 • 与用于大规模生产的已经建立的制造方法相容	聚焦的离子束研磨 • 连续处理从而每个纳米孔被循序研磨 • 冗长且昂贵的处理并因此仅适用于小规模制作

图20

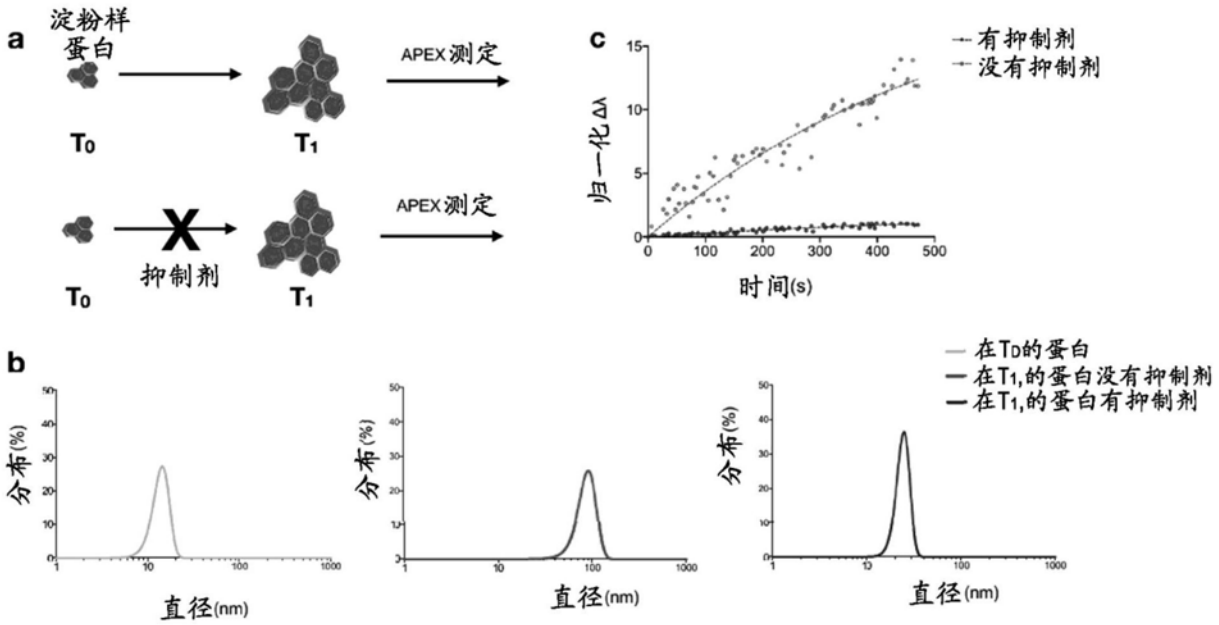

a
淀粉样蛋白
T0
T1
APEX测定
抑制剂
APEX测定
T0
T1
c
有抑制剂
没有抑制剂
归一化Δλ
时间(s)
b
在TD的蛋白
在T1,的蛋白没有抑制剂
在T1,的蛋白有抑制剂
分布(%)
直径(nm)
分布(%)
直径(nm)
分布(%)
直径(nm)

图21

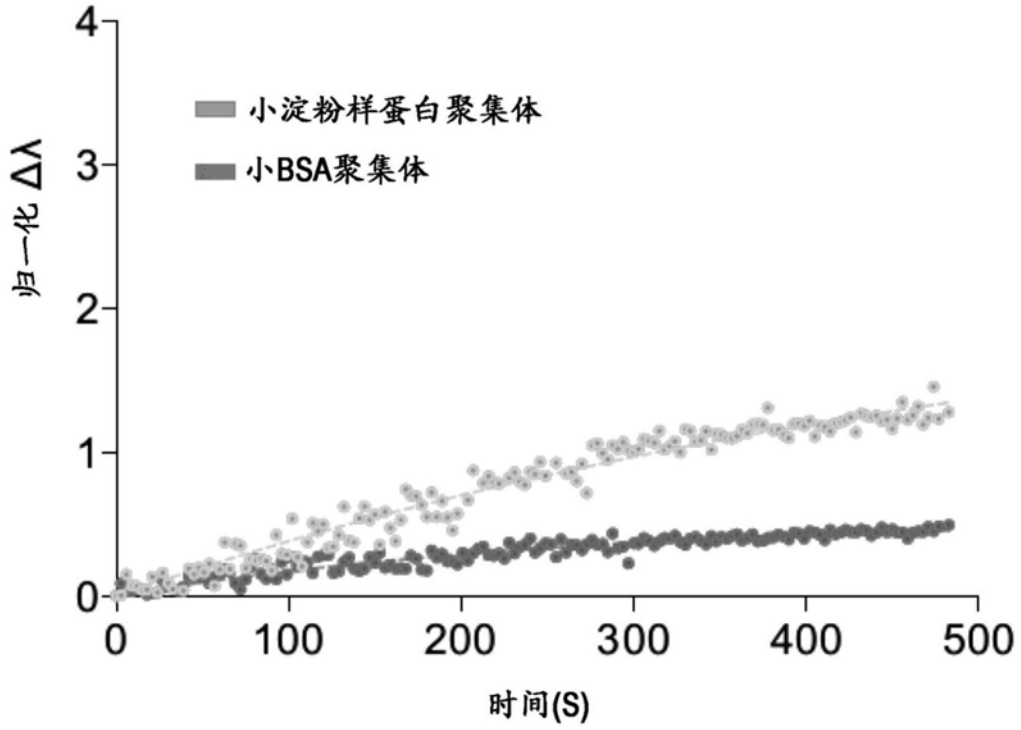

小淀粉样蛋白聚集体
小BSA聚集体
归一化 Δλ
时间(S)

图22

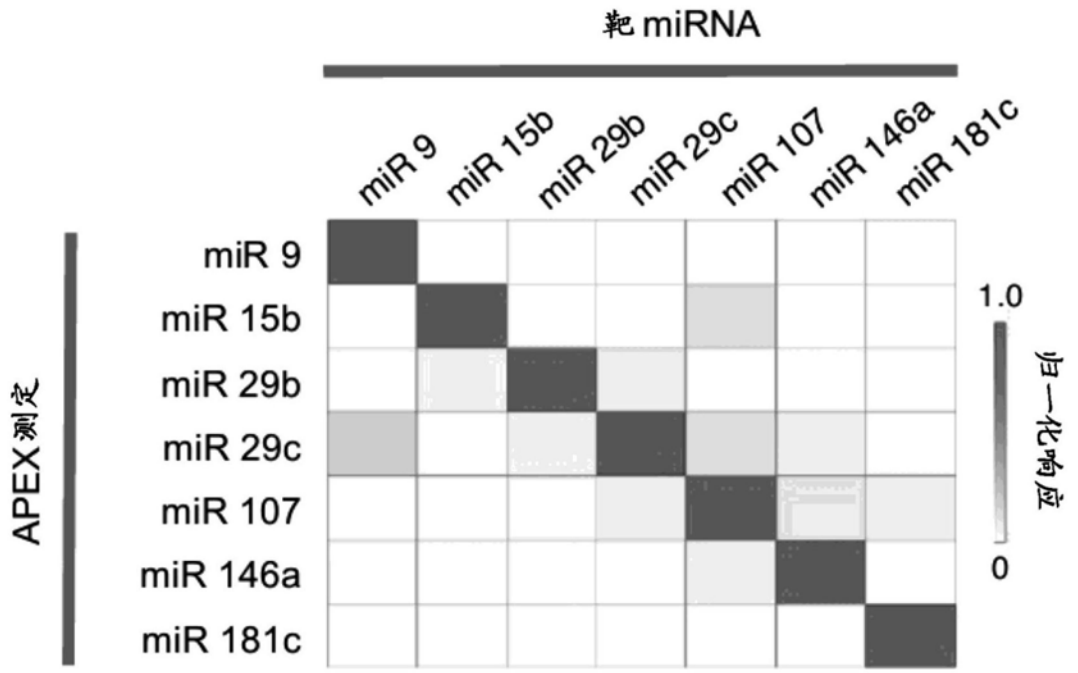

靶 miRNA
miR 9
miR 15b
miR 29b
miR 29c
miR 107
miR 146a
miR 181c
APEX测定
miR 9
miR 15b
miR 29b
miR 29c
miR 107
miR 146a
miR 181c
1.0
0
归一化响应

图23