



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113049552 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 05

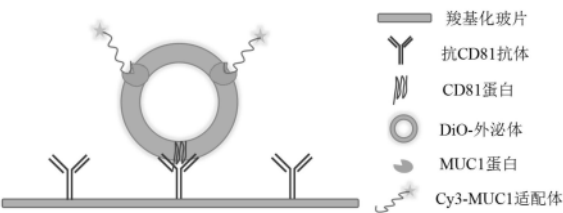
(21) 申请号 202110248271.9	CN 106053405 A,2016.10.26
(22) 申请日 2021.03.07	CN 1793862 A,2006.06.28
(65) 同一申请的已公布的文献号	US 2020080997 A1,2020.03.12
申请公布号 CN 113049552 A	CN 108192951 A,2018.06.22
(43) 申请公布日 2021.06.29	CN 111537480 A,2020.08.14
(73) 专利权人 天津大学	US 2020025685 A1,2020.01.23
地址 300072 天津市南开区卫津路92号	CN 109182362 A,2019.01.11
(72) 发明人 张鹏飞 李珍珍 陈达 肖乐辉	US 2021025879 A1,2021.01.28
(74) 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代	CN 106674343 A,2017.05.17
理事务所 12201	EP 2265931 A1,2010.12.29
专利代理师 李丽萍	CN 111518668 A,2020.08.11
(51) Int.Cl.	CN 102033056 A,2011.04.27
G01N 21/64 (2006.01)	US 2019339204 A1,2019.11.07
G01N 33/574 (2006.01)	US 2020354777 A1,2020.11.12
G01N 33/68 (2006.01)	US 2020200740 A1,2020.06.25
(56) 对比文件	US 2019086416 A1,2019.03.21
US 2020191778 A1,2020.06.18	US 2013078658 A1,2013.03.28
	审查员 白江波
	权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

基于外泌体检测和单分子荧光漂白技术的MUC1蛋白定量检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于外泌体检测和单分子荧光漂白技术的MUC1蛋白定量检测方法,包括的步骤是:从被测对象的血清中提取外泌体;用抗体捕获外泌体,使用细胞膜荧光染料对其进行染色;加入荧光染料标记的MUC1蛋白适配体,孵育后与外泌体膜上的乳腺癌标志MUC1蛋白结合;通过激光全内反射荧光显微镜观察外泌体和适配体的共定位,并进一步采用单分子荧光漂白技术对乳腺癌标志蛋白进行定量检测。本发明方法操作简单、成本低、灵敏度高、特异性高,适合实验室常规开展检测。将本发明检测结果得到的MUC1表达量与健康人血清中单个外泌体MUC1蛋白表达量进行对比,从而对被检测对象是否患有乳腺癌进行辅助评估。



1. 一种基于外泌体检测和单分子荧光漂白技术的MUC1蛋白定量检测方法,其特征在于,包括如下具体步骤:

(1) 从血清中提取外泌体

a. 用1×磷酸盐缓冲液稀释血清,依次以800×g离心力离心5min、2000×g离心力离心10min和10000×g离心力离心30min,以去除完整的细胞和细胞碎片;

b. 取上清液,并用0.22μm孔径的过滤器过滤,将过滤后的上清液以100000×g离心力离心2h,去上清,将底部沉淀重悬于1×磷酸盐缓冲液中,以100000×g离心力离心2h,所得沉淀为外泌体;将该外泌体重悬于1×磷酸盐缓冲液中,并在-80℃下保存备用;

(2) 用抗体捕获外泌体,使用细胞膜荧光染料对其进行染色

a. 在羧酸功能化玻片的通道中加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐/N-羟基琥珀酰亚胺混合物,室温孵育2h;

b. 用滤纸引流并加入抗CD81抗体,室温孵育2h;用滤纸引流,加入含5%牛血清白蛋白的pH7.0的磷酸盐缓冲液PBS,室温孵育2h后用1×磷酸盐缓冲液冲洗3次;

c. 加入步骤(1)提取的外泌体样品,室温孵育1h,用1×磷酸盐缓冲液冲洗3次;

d. 加入荧光染料DiO,室温孵育10min,使染料和外泌体膜囊泡反应;然后用1×磷酸盐缓冲液冲洗3次;

(3) 加入荧光染料Cy3标记的MUC1蛋白适配体序列,室温孵育1h,用1×磷酸盐缓冲液冲洗3次,MUC1蛋白适配体序列与外泌体膜上的MUC1蛋白结合,得到待测样品;

(4) 通过激光全内反射荧光显微镜观察外泌体和适配体的共定位,并进一步采用单分子荧光漂白技术对MUC1蛋白进行定量检测

a. 分别用荧光染料DiO和荧光染料Cy3的激发波长的光激发待测样品,然后在全内反射荧光显微镜下观察荧光染料DiO和荧光染料Cy3荧光分子发光,分别得到DiO通道和Cy3通道中的荧光图像,并记录Cy3通道中的单分子光漂白过程;

b. 单个外泌体中MUC1蛋白表达量的确定:通过全内反射荧光显微镜Cy3通道观察荧光分子漂白总步数,从而确定外泌体表面MUC1蛋白的表达量;通过全内反射荧光显微镜DiO通道中的图像计算出外泌体数目;计算外泌体表面MUC1蛋白的表达量和外泌体数目的比值,得到单个外泌体表面MUC1蛋白表达量。

2. 根据权利要求1所述的MUC1蛋白定量检测方法,其特征在于,步骤(1)中的所有离心过程均为差速超速离心法,并在4℃完成。

3. 根据权利要求1所述的MUC1蛋白定量检测方法,其特征在于,步骤(2)中,所述抗体为抗CD81抗体,CD81蛋白是外泌体跨膜蛋白,在各种细胞来源的外泌体表面广泛且高表达。

4. 根据权利要求1所述的MUC1蛋白定量检测方法,其特征在于,步骤(2)中,荧光染料DiO为发绿色荧光的DiO,其激发波长为473nm,荧光发射在501nm。

5. 根据权利要求1所述的MUC1蛋白定量检测方法,其特征在于,步骤(3)中,荧光染料Cy3为发橙色荧光的Cy3,其激发波长为532nm,荧光发射在568nm。

6. 根据权利要求1所述方法在定量检测外泌体表面MUC1蛋白表达中的应用。

基于外泌体检测和单分子荧光漂白技术的MUC1蛋白定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学检测技术领域,尤其涉及一种人体外泌体MUC1蛋白定量检测方法。

背景技术

[0002] 乳腺癌是严重危害妇女健康的常见恶性肿瘤之一,全球乳腺癌发病率自20世纪70年代末开始一直呈上升趋势,已成为当前社会的重大公共卫生问题。部分女性死于这种疾病,主要原因为肿瘤的早期转移、药物耐药、肿瘤复发等。因此,乳腺癌的早期诊断对改善患者无复发生存率和提高无病生存率至关重要。

[0003] 目前,超声、全数字化X线乳腺钼靶、磁共振成像等影像学检查广泛应用于乳腺癌的筛查,但这些技术均局限于对较大的肿瘤的检测。临床上另一种常规检测方法为病理检查,对从病人体内取出的活体组织进行染色观察,通过细胞的形态和结构判断是否出现癌变。但这种方法不仅存在取样位置局限给检测结果造成极大的偏差,还因为其侵入性给患者带来极大痛苦。对乳腺癌的筛查和治疗监控还可以通过检测血清学肿瘤标志物和分子生物标志物,但因存在灵敏度低、特异性差等问题,不能及时筛选出早期乳腺癌患者外周血中的肿瘤细胞。因此,研发一种简单高效、无创性、成本低和灵敏度高、特异性强的检测技术以实现乳腺癌的早期快速诊断尤其重要。近些年来发展的液体活检技术通过体外无创抽血的方式获取肿瘤脱落在血液中的循环肿瘤细胞(CTCs)、循环肿瘤DNA(ctDNA)和外泌体(Exosome),以此来实现对癌症的早期筛查和动态监测。而与前两者存在来源不确定、检出率低、特异性差等缺点相比,外泌体在癌症的早期诊断中成为更有希望的靶点。

[0004] 外泌体是一种能被机体内大多数细胞在正常及病理状态下均可分泌的脂质双层膜囊泡,直径大约30-150nm,普遍存在于唾液、血清、尿液、眼泪和其他体液中。外泌体中富含核酸、蛋白、胆固醇等,在细胞通讯中起着重要作用。肿瘤来源的外泌体可以转移肿瘤基因的内容物,调节受体细胞的基因表达,从而在肿瘤的发生、发展、转移以及耐药中发挥关键作用。此外,外泌体在其表面携带多种肿瘤特异性蛋白,其蛋白水平通常与疾病状况有关,可以预测亲代肿瘤的起源。乳腺癌特异性表达的蛋白有MUC1、HER2、EpCAM和CEA等,其中,MUC1蛋白的表达水平能反映乳腺癌的某些生物学特征,与乳腺癌的发生、转移、预后等关系密切。MUC1蛋白在乳腺癌组织中出现质和量的异常表达,因此成为十分重要的癌标志物。外泌体作为一种新的生物标志物,可用于乳腺癌的特异性检测。特别是外泌体表面蛋白的评估对肿瘤的诊断和预后具有重要的研究意义。

[0005] 为了分析整个外泌体生物信息,需要采用分子传感器来区分源自癌症的外泌体和正常细胞之间的细微差异。目前,常规的外泌体检测主要采用免疫印迹法、酶联免疫吸附法、电化学传感、微流体传感等方法。但这些方法存在成本高、样品量多、程序复杂、灵敏度低等局限性。而荧光检测具有低毒性、成本低、多样性以及灵敏度高等优点。荧光分子被广泛用于抗体标记和DNA探针标记,便于通过抗原/抗体相互作用和核酸杂交来检测外泌体。

荧光传感一般都对大量的分子进行测量。通常情况下,很难注意到这些信号的细微变化,这大大限制了这些方法的灵敏度。而单分子检测技术可以在单个荧光分子成像的基础上连续观察溶液中荧光分子的强度变化。通过单分子荧光漂白技术(SMP)可以实现对荧光分子的定量检测。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种MUC1蛋白定量检测方法,是基于外泌体检测和单分子荧光漂白技术定量检测人类外泌体表面MUC1蛋白的方法,该方法可以解决现有技术中操作复杂、成本高、灵敏度低、特异性低等问题。

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明提出的一种基于外泌体检测和单分子荧光漂白技术的MUC1蛋白定量检测方法,包括如下具体步骤:

[0008] (1) 从血清中提取外泌体

[0009] a. 用1×磷酸盐缓冲液稀释血清,依次以800×g离心力离心5min、2000×g离心力离心10min和10000×g离心力离心30min,以去除完整的细胞和细胞碎片;

[0010] b. 取上清液,并用0.22μm孔径的过滤器过滤,将过滤后的上清液以100000×g离心力离心2h,去上清,将底部沉淀重悬于1×磷酸盐缓冲液中,以100000×g离心力离心2h,所得沉淀为外泌体;将该外泌体重悬于1×磷酸盐缓冲液中,并在-80℃下保存备用;

[0011] (2) 用抗体捕获外泌体,使用细胞膜荧光染料对其进行染色

[0012] a. 在羧酸功能化玻片的通道中加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)混合物,室温孵育2h;

[0013] b. 用滤纸引流出并加入抗CD81抗体,室温孵育2h;用滤纸引流出,加入含5%牛血清白蛋白(BSA)的pH7.0的磷酸盐缓冲液PBS,室温孵育2h后用1×磷酸盐缓冲液冲洗3次;

[0014] c. 加入步骤(1)提取的外泌体样品,室温孵育1h,用1×磷酸盐缓冲液冲洗3次;

[0015] d. 加入荧光染料DiO,室温孵育10min,使染料和外泌体膜囊泡反应;然后用1×磷酸盐缓冲液冲洗3次;

[0016] (3) 加入荧光染料Cy3标记的MUC1蛋白适配体序列,室温孵育1h,用1×磷酸盐缓冲液冲洗3次,MUC1蛋白适配体序列与外泌体膜上的MUC1蛋白结合,得到待测样品;

[0017] (4) 通过激光全内反射荧光显微镜观察外泌体和适配体的共定位,并进一步采用单分子荧光漂白技术对MUC1蛋白进行定量检测

[0018] a. 分别用荧光染料DiO和荧光染料Cy3的激发波长的光激发待测样品,然后在全内反射荧光显微镜下观察荧光染料DiO和荧光染料Cy3荧光分子发光,分别得到DiO通道和Cy3通道中的荧光图像,并记录Cy3通道中的单分子光漂白过程;

[0019] b. 单个外泌体中MUC1蛋白表达量的确定:通过全内反射荧光显微镜Cy3通道观察荧光分子漂白总步数,从而确定外泌体表面MUC1蛋白的表达量;通过全内反射荧光显微镜DiO通道中的图像计算出外泌体数目;计算外泌体表面MUC1蛋白的表达量和外泌体数目的比值,得到单个外泌体表面MUC1蛋白表达量。

[0020] 其中步骤(1)中的所有离心过程均为差速超速离心法,并在4℃完成。

[0021] 荧光染料DiO的激发波长为473nm;荧光染料Cy3的激发波长为532nm。

[0022] 本发明的另一个目的是提供所述方法在定量检测外泌体表面MUC1蛋白表达中的

应用。

[0023] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:本发明利用SMP技术直接定量荧光分子标记的特异性蛋白的数目。尤其是,SMP方法能够在特异性蛋白数目比较低时对蛋白的表达数目进行精确确定。基于单分子荧光成像的光漂白事件计数是一种新兴的化学计量学研究技术,与传统的生物分析方法相比具有明显的优势。本发明方法具有操作简单、成本低、灵敏度高、特异性高等特点,适合实验室常规开展检测。将本发明检测结果得到的MUC1表达量与健康人血清中单个外泌体MUC1蛋白表达量进行对比,从而对被检测对象是否患有乳腺癌进行辅助评估。

附图说明

[0024] 图1是本发明检测方法的原理图;

[0025] 图2是本发明中荧光染料DiO和Cy3的共定位效果图;

[0026] 图3是本发明中对Cy3荧光分子进行单分子光漂白的示意图。

具体实施方式

[0027] 下面结合附图及具体实施例对本发明做进一步的说明,但下述实施例绝非对本发明有任何限制。

[0028] 本发明提出的基于外泌体检测和单分子荧光漂白技术的MUC1蛋白定量检测方法,主要包括如下具体步骤:采集被检测对象血清并提取外泌体;用抗体捕获外泌体,使用细胞膜荧光染料对其进行染色;加入荧光染料标记的MUC1蛋白适配体,孵育后与外泌体膜上的乳腺癌标志MUC1蛋白结合;通过激光全内反射荧光显微镜观察外泌体和适配体的共定位,并进一步采用单分子荧光漂白技术对乳腺癌标志蛋白进行定量检测。图1示出了本发明检测方法的原理图,本发明中采用的特异性抗体为抗CD81抗体,CD81蛋白是外泌体跨膜蛋白,在各种细胞来源的外泌体表面广泛且高表达。

[0029] 本发明基于外泌体检测和单分子荧光漂白技术,具有操作简便、灵敏度高、检测成本低、特异性高等优势,将检测到的MUC1表达量与健康人血清中单个外泌体MUC1蛋白表达量进行对比,从而对被检测对象是否患有乳腺癌做出诊断。利用本发明检测方法可在单分子水平上通过检测外泌体表面蛋白表达量对被测对象是乳腺癌患者还是健康人进行辅助评估,对乳腺癌的早期诊断和疗效监控检测具有重要意义。

[0030] 实施例1:

[0031] 本发明应用基于外泌体检测和单分子荧光漂白技术的MUC1蛋白定量检测人体外泌体表面MUC1蛋白的方法通过对乳腺癌疑似患者检测得到的MUC1表达量与健康人血清中单个外泌体MUC1蛋白表达量进行对比,从而对被检测对象发生乳腺癌的几率进行辅助评估。

[0032] 1乳腺癌疑似患者血清中外泌体的提取

[0033] 对乳腺癌疑似患者进行静脉取血,采血完毕后,静置60min使其分层。此后,以2000×g离心力离心15min,取上清即为血清样本。用无菌1×PBS(磷酸缓冲盐溶液)稀释血清,依次以800×g离心力离心5min,2000×g离心力离心10min,10000×g离心力离心30min,以去除完整的细胞和细胞碎片等沉淀。取上清液,并用0.22μm孔径的过滤器过滤介质。将过滤后

的上清液在 $100000\times g$ 离心力离心2h,去上清,所得沉淀为外泌体和污染蛋白质。将底部沉淀重悬于 $1\times$ PBS缓冲液中,以 $100000g$ 离心2h,所得沉淀为外泌体。最后将外泌体重悬于无菌PBS溶液中并在 -80°C 下保存备用。上述的所有离心过程均为差速超速离心法,并都是在 4°C 完成的。

[0034] 2、抗体捕获外泌体

[0035] 本实施例中,采用的特异性抗体为抗CD81抗体,CD81蛋白是外泌体跨膜蛋白,在各种细胞来源的外泌体表面广泛且高表达。

[0036] 首先,在羧酸功能化玻片的通道中加入 $15\mu\text{L}$ 浓度为 5mM 的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)混合物,室温孵育2h;其次,用滤纸引流出并加入 $15\mu\text{L}$ 浓度为 $10\mu\text{g/mL}$ 的抗CD81抗体,室温孵育2h;用滤纸引流出,加入 $15\mu\text{L}$ 含5%牛血清白蛋白(BSA)的 $1\times$ PBS($\text{pH}7.0$),室温孵育2h后用 $1\times$ PBS冲洗3次;最后,加入 $15\mu\text{L}$ 提取的外泌体样品,室温孵育1h,用 $1\times$ PBS冲洗3次。

[0037] 3、外泌体膜染色

[0038] 在上一步骤的基础上加入 $15\mu\text{L}$ 浓度为 $1\mu\text{M}$ 的DiO膜染料,该DiO膜染料的激发波长为 473nm ,室温孵育 10min ,使染料和外泌体膜囊泡反应,最后用 $1\times$ PBS冲洗3次。

[0039] 4、荧光染料Cy3标记的MUC1蛋白适配体识别外泌体

[0040] 标记MUC1蛋白适配体的荧光染料为发橙色荧光的Cy3,其激发波长为 532nm 。Cy3染料标记的MUC1蛋白适配体识别外泌体膜上的乳腺癌标志MUC1蛋白的具体操作是:在上一步骤的基础上分别加入 $15\mu\text{L}$ 浓度为 100pM 的Cy3标记的MUC1蛋白适配体序列,室温孵育1h,用 $1\times$ PBS冲洗3次,MUC1蛋白适配体序列与外泌体膜上的MUC1蛋白结合,得到待测样品;

[0041] 5、通过显微镜观察外泌体和适配体的共定位,采用单分子荧光漂白技术检测外泌体

[0042] 分别用 473nm 和 532nm 光激发待测样品,然后在全内反射荧光显微镜下观察DiO和Cy3分子发光,可以显示这两种染料的共定位情况以及Cy3光漂白过程。分别得到DiO通道和Cy3通道中的荧光图像,并记录Cy3通道中的单分子光漂白过程。荧光染料DiO和Cy3的共定位效果图如图2所示,对Cy3荧光分子进行单分子光漂白的示意图如图3所示。

[0043] 6、数据处理,单个外泌体中蛋白标志物表达量

[0044] (I)通过全内反射荧光显微镜Cy3通道观察荧光分子漂白总步数,从而确定出外泌体表面MUC1蛋白的表达量;

[0045] (II)通过全内反射荧光显微镜DiO通道中的图像计算出外泌体数目;

[0046] (III)计算(I)确定的外泌体表面MUC1蛋白的表达量和(II)计算出外泌体数目的比值的比值,得到该被测样品单个外泌体表面MUC1蛋白表达量。

[0047] 6、对被检测对象发生乳腺癌的几率进行辅助评估

[0048] 当被测对象的血清样品中单个外泌体MUC1蛋白表达量明显高于健康人血清样品中单个外泌体MUC1蛋白表达量时,则表明该被测对象发生乳腺癌的几率大于正常人群。

[0049] 尽管上面结合附图对本发明进行了描述,但是本发明并不局限于上述的具体实施方式,上述的具体实施方式仅仅是示意性的,而不是限制性的,本领域的普通技术人员在本发明的启示下,在不脱离本发明宗旨的情况下,还可以做出很多变形,这些均属于本发明的保护之内。

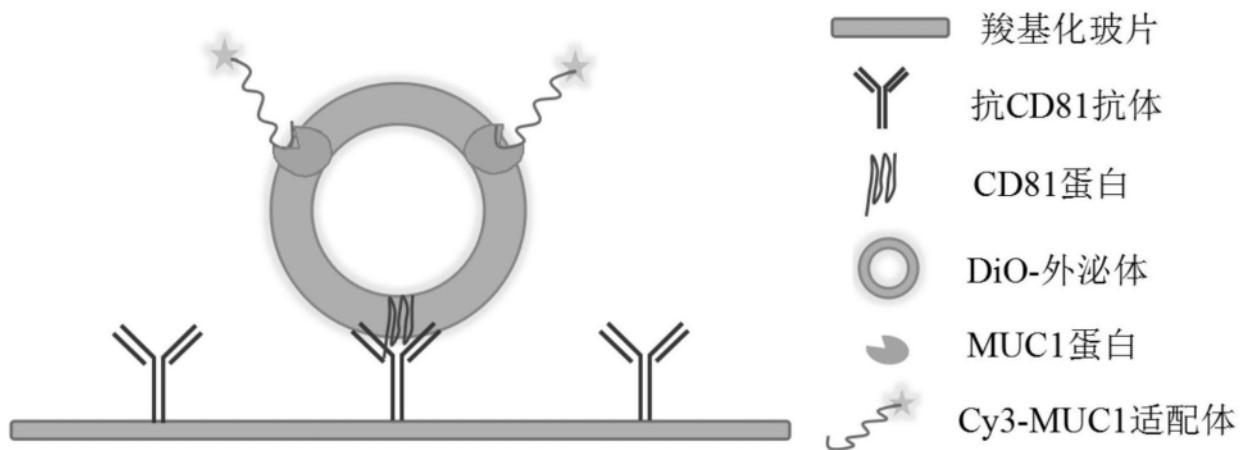


图1

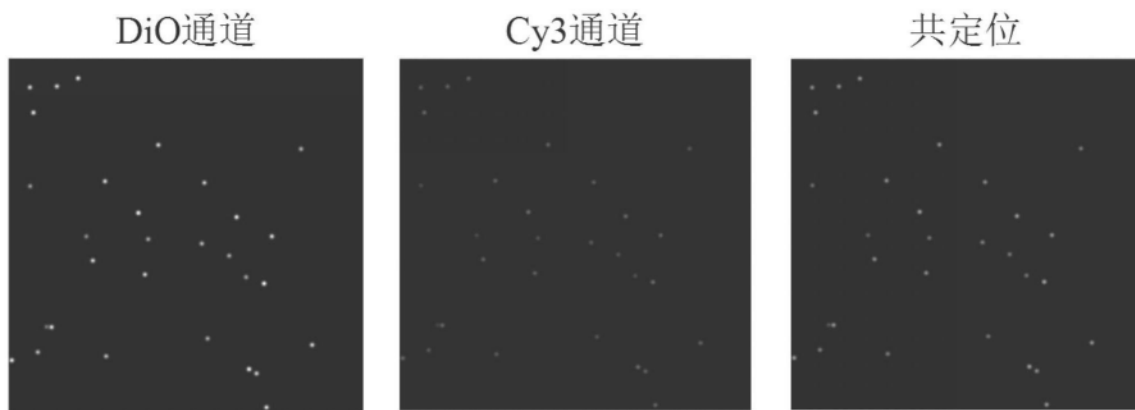


图2

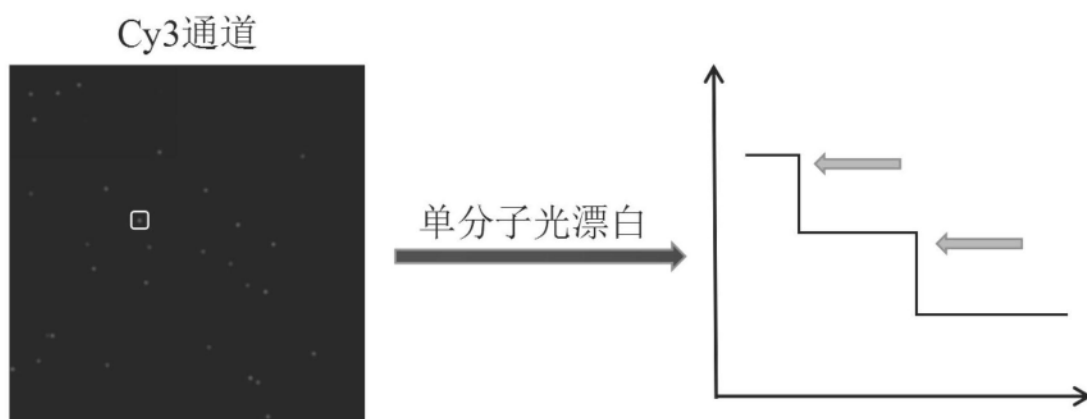


图3