



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109374893 A

(43)申请公布日 2019.02.22

(21)申请号 201811321152.6

(22)申请日 2018.11.07

(71)申请人 国家纳米科学中心

地址 100190 北京市海淀区中关村北一条
11号

(72)发明人 孙佳姝

(74)专利代理机构 北京中索知识产权代理有限公司 11640

代理人 张立成

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

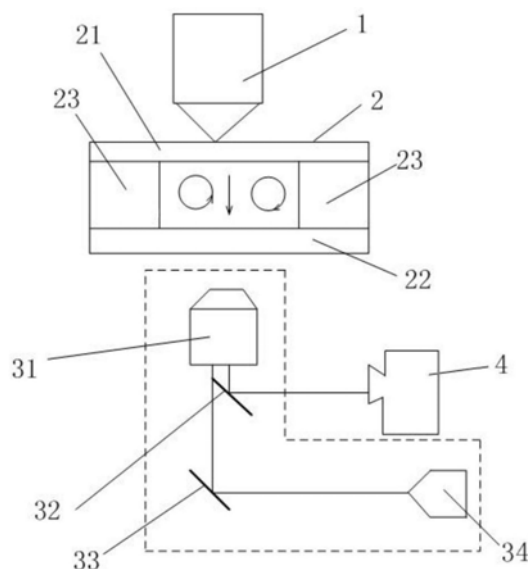
权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

基于热泳对PD-L1受体的检测系统及方法

(57)摘要

一种基于热泳对PD-L1受体的检测系统及方法,包括:用以对待测者血液中细胞外囊泡进行加热的加热单元;设置在所述加热单元一侧的样品仓室单元;设置在所述样品仓室单元一侧的信号处理单元,所述信号处理单元对至少一种光信号参量进行获取,通过量化光参量并对其进行统计计算,获取单一种类蛋白表达强度。本发明通过使用适体或抗体对患者血液细胞中的细胞外囊泡进行光标记,并使用检测单元对光标记中的光参量进行检测和处理,通过量化光参量并对其进行统计计算,能够快速准确的得出细胞外囊泡的表达蛋白强度,检测精度高。



1. 一种基于热泳对PD-L1受体的检测系统,其特征在于,包括:

用以对待测者血液中的细胞外囊泡进行加热的加热单元;

设置在所述加热单元一侧,用以装载细胞外囊泡的样品仓室单元,所述样品仓室单元内细胞外囊泡中PD-L1受体能够与适体或抗体发生特异性结合而标记光信号,在所述加热单元对所述样品仓室单元加热后,所述样品仓室单元内产生热泳效应及对流,将细胞外囊泡汇聚在所述样品仓室单元内温度较低的一侧;

设置在所述样品仓室单元远离所述加热单元的一侧,用以放大和反射光信号的信号放大单元,所述信号放大单元会将光信号反射至指定位置;

设置在所述样品仓室单元一侧,用以对放大后的光信号进行采集和计算的信号处理单元,所述信号处理单元对至少一种光信号参量进行获取,通过量化光参量并对其进行统计计算,获取单例细胞外囊泡中PD-L1受体的表达强度均值。

2. 根据权利要求1所述的基于热泳对PD-L1受体的检测系统,其特征在于,所述化学发光的过程为:先将带有发光催化物的适体或抗体与细胞外囊泡一同孵育,通过特异性结合将发光催化物标记在细胞外囊泡表面上,并在将细胞外囊泡移入样品仓室单元时向其内部添加发光底物,通过发光底物在发光催化物催化作用下达到激发态,在转化为基态过程中释放光能使细胞外囊泡表面标记光信号。

3. 根据权利要求1所述的基于热泳对PD-L1受体的检测系统,其特征在于,所述加热单元为设有聚焦装置的激光加热器,通过改变焦点以调节具体加热位置。

4. 根据权利要求1所述的基于热泳对PD-L1受体的检测装置,其特征在于,所述样品仓室单元设置在所述加热单元一侧,用以装载所述细胞外囊泡和适体或抗体,包括设置在所述加热单元一侧,用以吸收所述加热单元热量的第一导热面;

设置在所述第一导热面下方,用以吸收所述加热单元热量的第二导热面;

设置在所述第一导热面与第二导热面之间且在中心开设有通孔,用以装载细胞外囊泡的垫片。

5. 根据权利要求4所述的基于热泳对PD-L1受体的检测系统,其特征在于,所述第一导热面和第二导热面均为透明材质,且第二导热面的导热性高于第一导热面的导热性。

6. 根据权利要求1所述的基于热泳对PD-L1受体的检测系统,其特征在于,所述信号放大单元设置在所述样品仓室单元远离所述加热单元的一侧,用以放大细胞外囊泡表面的光信号,包括:

设置在所述第二导热面远离所述加热单元的一侧,用以观察光信号的物镜;

设置在所述物镜远离所述加热单元的一侧并与所述物镜呈一定夹角,用以反射光标记的采集反光镜;

设置在所述物镜远离所述加热单元的一侧并与所述物镜呈一定夹角,用以反射光源的放大反光镜;

设置在所述放大反光镜一侧,用以为光标记提供放大光源的观测光源。

7. 根据权利要求2所述的基于热泳对PD-L1受体的检测系统,其特征在于,所述信号处理单元根据检测装置需要检测的光参量,为CCD相机、照度计、分光计、单色器、sCMOS、EMCCD、PMT中的一种或多种。

8. 根据权利要求2所述的基于热泳对PD-L1受体的检测系统,其特征在于,所述检测系

统还可用于检测PD-1受体。

9. 一种基于热泳对PD-L1受体的检测方法,其特征在于,包括:

获取指定细胞中的细胞外囊泡,将其与带有光标记的适体或抗体一同孵育,通过适体或抗体与细胞外囊泡中PD-L1受体进行特异性结合,以将细胞外囊泡表面标记上光;

将孵育后的细胞外囊泡放入样品仓室单元,并对样品仓室单元加热以产生热泳效应和对流,将细胞外囊泡汇聚在所述样品仓室单元内的低温一侧,以放大细胞外囊泡上的光信号,通过对至少一种光信号参量进行计算以将光信号转换成对应的具体单一种类数值,对同种细胞中的不同细胞外囊泡进行多次测量,得出PD-L1受体在一种细胞中表达强度的数值组;

重复上述步骤,分别得出PD-L1受体在不同种类细胞的细胞外囊泡表达强度数值组,对不同数值组进行统计计算,并绘制PD-L1受体表达强度分布对比图,根据分布对比图得出PD-L1受体在不同种类细胞的平均表达强度。

10. 一种基于热泳利用化学发光对PD-L1受体的检测方法,其特征在于,包括:

获取指定细胞中的细胞外囊泡,将其与带有发光催化物的适体或抗体一同孵育培养,通过适体或抗体与细胞外囊泡中PD-L1受体进行特异性结合,以将细胞外囊泡表面标记上发光催化物;

将孵育后的细胞外囊泡放入样品仓室单元,并对样品仓室单元内加入发光底物,使细胞外囊泡表面发光催化物催化发光底物而使其达到激发态,并在其转化为基态过程中释放光能,以使细胞外囊泡表面带有光信号;

对样本仓室单元加热以产生热泳效应和对流,将细胞外囊泡汇聚在所述样本仓室单元内的低温侧,以放大细胞外囊泡上的光信号;放大后,使用信号处理单元对光信号进行采集和分析,通过对至少一种光信号参量进行计算以将光信号转换成对应的具体单一种类数值,对同种细胞中的不同细胞外囊泡进行多次测量,得出PD-L1受体在一种细胞中表达强度的数值组;

重复上述步骤,分别得出PD-L1受体在不同种类细胞的细胞外囊泡表达强度数值组,对不同数值组进行统计计算,并绘制PD-L1受体表达强度分布对比图,根据

分布对比图得出PD-L1受体在不同种类细胞的平均表达强度。

基于热泳对PD-L1受体的检测系统及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及癌症诊断技术领域,尤其涉及一种基于热泳对PD-L1受体的检测系统及方法。

背景技术

[0002] PD-1全称程序性死亡受体1,英文名字为programmed death 1,是一种重要的免疫抑制分子,为CD28超家族成员。以PD-1为靶点的免疫调节在抗肿瘤、抗感染、抗自身免疫性疾病及器官移植存活等方面均有重要的意义。其配体PD-L1也可作为靶点,相应的抗体也可以起到相同的作用。PD-L1全称程序性死亡-配体1,英文名字programmed cell death-Ligand 1,是大小为40kDa的第一型跨膜蛋白。正常情形下免疫系统会对聚集在淋巴结或脾脏的外来抗原产生反应,促进具有抗原特异性的T细胞增生。而程序性死亡受体1 (PD-1) 与程序性死亡-配体1 (PD-L1) 结合,可以传导抑制性的信号,减低T细胞的增生。肿瘤细胞逃避T细胞摧毁的一种途径是通过在它表面产生PD-L1,当免疫细胞T细胞表面的PD-1识别PD-L1后,可以传导抑制行信号,T细胞就不能发现肿瘤细胞和向肿瘤细胞发出攻击信号。

[0003] 程序性死亡受体-1 (PD-1) 是主要的免疫检查点受体,通过结合其配体程序性死亡配体-1 (PD-L1),使T细胞效应功能的下调,从而有助于维持对肿瘤细胞的耐受性。通过抗PD-1和抗PD-L1抗体阻断这些通路,可能有助于阻止这种下调从而使T细胞维持其抗肿瘤特性和介导肿瘤细胞死亡的能力。目前市场上针对PD-1和PD-L1的抑制剂主要有三种,pembrolizumab、Nivolumab和Atezolizumab,可用于黑色素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌等多种癌症的治疗。但是,并不是所有患者都能从PD-1/PD-L1抑制剂治疗过程中受益,PD-1/PD-L1抑制剂目前只在少部分的癌症病人身上可以产生持久控制肿瘤的效果。因此,检测病人是否有PD-L1阳性表达,能够有效帮助病人选择合适的药物用于治疗。目前,PD-1/PD-L1的检测方法主要是基于细胞蛋白水平的检测,在临床中,主要采用免疫组化的方法,利用手术或穿刺后取得的肿瘤组织进行切片染色。免疫组化的结果与病理医师的经验密切相关。除了染色技术外,抗体的特异性也尤其重要。而目前我国PD-L1的检测比较混乱,一是染色技术和条件的不统一;二是染色抗体的多样;三是病理评价标准尚未统一,这些都导致了国内患者使用免疫组化评价PD-L1水平的价值降低。另外,由于免疫组化必须取得组织进行检测,无论是通过手术或者穿刺的手法,都是一种有创操作,会对病人造成伤害。同时,在临床实验研究表明,阻断PD-L1可以有效地治疗或抑制肿瘤生长。因此,临床上需要简便易行的检测手段筛选出肿瘤组织或细胞高度表达PD-L1的肿瘤患者,为个性化地进行阻断PD-L1的治疗提供指导和依据。而现有的用于检测PD-L1的试剂盒存在灵敏度较低,以及特异性不高等缺点。因此,我们迫切需要一种新的无创的评价方法和标准较为稳定的PD-L1检测方法。

[0004] 中国专利公开号:CN201810312287.X公开了一种循环肿瘤细胞表面标志分子PD-L1的检测方法,包括以下步骤:(1) 将全血用红细胞裂解液处理,分离出有核细胞,并用甲醛进行固定;(2) 先通过肿瘤免疫光标志物细胞角蛋白抗体anti-CK进行阳性筛选,用PD-L1一抗孵育所有细胞,然后用标记有FITC光基团的PD-L1二抗孵育,再用细胞核光染料DAPI标记

出所有细胞；(3) 采用高通量多色成像分析，选择CY5、FITC和DAPI的滤光片，观察通道表面光颜色，最终实现对循环肿瘤细胞表面标志分子PD-L1的检测。由此可见，上述检测方法存在以下问题。

[0005] 第一、所述检测方法在取样时，会使用红细胞裂解液对血样进行裂解处理，在得到有核细胞时，会有裂解后的残渣残存在液体中，对后续检测造成影响。

[0006] 第二、对PD-L1受体进行光标记后，光呈多色分布，在观测时无法针对单一种类颜色进行准确测量，测量精度低。

[0007] 第三、光标记分布过于分散，且没有将其聚积的方法，这样会导致光信号过于衰弱，以至于在对光标记进行检测时无法得到高精度结果。

发明内容

[0008] 为此，本发明提供一种基于热泳对PD-L1受体的检测系统及方法，用以克服现有技术中由于荧光颜色种类多导致检测精度低的问题。

[0009] 一方面，本发明提供一种基于热泳对PD-L1受体的检测系统，包括：

[0010] 用以对待测者血液中的细胞外囊泡进行加热的加热单元；

[0011] 设置在所述加热单元一侧，用以装载细胞外囊泡的样品仓室单元，所述样品仓室单元内细胞外囊泡中PD-L1受体能够与适体或抗体发生特异性结合而标记光信号，在所述加热单元对所述样品仓室单元加热后，所述样品仓室单元内产生热泳效应及对流，将细胞外囊泡汇聚在所述样品仓室单元内温度较低的一侧；

[0012] 设置在所述样品仓室单元远离所述加热单元的一侧，用以放大和反射光信号的信号放大单元，所述信号放大单元会将光信号反射至指定位置；

[0013] 设置在所述样品仓室单元一侧，用以对放大后的光信号进行采集和计算的信号处理单元，所述信号处理单元对至少一种光信号参量进行获取，通过量化光参量并对其进行统计计算，获取单例细胞外囊泡中PD-L1受体的表达强度均值。

[0014] 进一步地，所述化学发光的过程为：先将带有发光催化物的适体或抗体与细胞外囊泡一同孵育，通过特异性结合将发光催化物标记在细胞外囊泡表面上，并在将细胞外囊泡移入样品仓室单元时向其内部添加发光底物，通过发光底物在发光催化物催化作用下达至激发态，在转化为基态过程中释放光能以使细胞外囊泡表面标记光信号。

[0015] 进一步地，所述加热单元为设有聚焦装置的激光加热器，通过改变焦点以调节具体加热位置。

[0016] 进一步地，所述样品仓室单元设置在所述加热单元一侧，用以装载所述细胞外囊泡和适体或抗体，包括设置在所述加热单元一侧，用以吸收所述加热单元热量的第一导热面；

[0017] 设置在所述第一导热面下方，用以吸收所述加热单元热量的第二导热面；

[0018] 设置在所述第一导热面与第二导热面之间且在中心开设有通孔，用以装载细胞外囊泡的垫片。

[0019] 进一步地，所述第一导热面和第二导热面均为透明材质，且第二导热面的导热性高于第一导热面的导热性。

[0020] 进一步地，所述信号放大单元设置在所述样品仓室单元远离所述加热单元的一

侧,用以放大细胞外囊泡表面的光信号,包括:

[0021] 设置在所述第二导热面远离所述加热单元的一侧,用以观察光信号的物镜;

[0022] 设置在所述物镜远离所述加热单元的一侧并与所述物镜呈一定夹角,用以反射光标记的采集反光镜;

[0023] 设置在所述物镜远离所述加热单元的一侧并与所述物镜呈一定夹角,用以反射光源的放大反光镜;

[0024] 设置在所述放大反光镜一侧,用以为光标记提供放大光源的观测光源。

[0025] 进一步地,所述信号处理单元根据检测装置需要检测的光参量,为CCD相机、照度计、分光计、单色器、sCMOS、EMCCD、PMT中的一种或多种。

[0026] 进一步地,所述检测系统还可用于检测PD-1受体。

[0027] 另一方面,本发明提供一种基于热泳对PD-L1受体的检测方法,包括:

[0028] 获取指定细胞中的细胞外囊泡,将其与带有光标记的适体或抗体一同孵育,通过适体或抗体与细胞外囊泡中PD-L1受体进行特异性结合,以将细胞外囊泡表面标记上光;

[0029] 将孵育后的细胞外囊泡放入样品仓室单元,并对样品仓室单元加热以产生热泳效应和对流,将细胞外囊泡汇聚在所述样品仓室单元内的低温一侧,以放大细胞外囊泡上的光信号,通过对至少一种光信号参量进行计算以将光信号转换成对应的具体单一种类数值,对同种细胞中的不同细胞外囊泡进行多次测量,得出PD-L1受体在一种细胞中表达强度的数值组;

[0030] 重复上述步骤,分别得出PD-L1受体在不同种类细胞的细胞外囊泡表达强度数值组,对不同数值组进行统计计算,并绘制PD-L1受体表达强度分布对比图,根据分布对比图得出PD-L1受体在不同种类细胞的平均表达强度。

[0031] 另一方面,本发明提供一种基于热泳利用化学发光对PD-L1受体的检测方法,包括:

[0032] 获取指定细胞中的细胞外囊泡,将其与带有发光催化物的适体或抗体一同孵育培养,通过适体或抗体与细胞外囊泡中PD-L1受体进行特异性结合,以将细胞外囊泡表面标记上发光催化物;

[0033] 将孵育后的细胞外囊泡放入样品仓室单元,并对样品仓室单元内加入发光底物,使细胞外囊泡表面发光催化物催化发光底物而使其达到激发态,并在其转化为基态过程中释放光能,以使细胞外囊泡表面带有光信号;

[0034] 对样本仓室单元加热以产生热泳效应和对流,将细胞外囊泡汇聚在所述样本仓室单元内的低温侧,以放大细胞外囊泡上的光信号;放大后,使用信号处理单元对光信号进行采集和分析,通过对至少一种光信号参量进行计算以将光信号转换成对应的具体单一种类数值,对同种细胞中的不同细胞外囊泡进行多次测量,得出PD-L1受体在一种细胞中表达强度的数值组;

[0035] 重复上述步骤,分别得出PD-L1受体在不同种类细胞的细胞外囊泡表达强度数值组,对不同数值组进行统计计算,并绘制PD-L1受体表达强度分布对比图,根据

[0036] 分布对比图得出PD-L1受体在不同种类细胞的平均表达强度。

[0037] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于,通过使用适体或抗体对患者血液细胞外囊泡的PD-L1受体进行光标记,并使用检测单元对光标记中光的物理参量进行检测和处

理,通过分析光参量能够快速准确的得出细胞外囊泡的PD-L1受体加权表达强度,检测精度高。尤其是,本发明通过采用多种物理参量的聚积检测,而非直接通过生物反应检测,检测过程更加简便及易操作,样本用量小,并且,通过物理参量的聚积检测,相比生物反应检测,其检测量的表达更容易量化,能够对PD-L1受体表达进行清晰判定。尤其,本发明对于细胞外囊泡PD-L1受体的光度的检测、及参量化,然后根据标准的PD-L1受体浓度与光信号中某种参量的标准函数关系,来确定PD-L1受体的表达强度。并且,在基于同一抗体或适体的检测过程中,通过对多种物理参量的检测及计算,相互比较,选取最优的物理参量的表达来确定最终的癌变结果。

[0038] 尤其,本发明采用化学发光和热泳效应、对流相结合的光聚积方式,通过与细胞外囊泡结合的适体或抗体中的发光催化物催化而达到激发状态,并在转化为基态过程中释放光能使细胞外囊泡表面标记光信号,在检测时,所述发光催化物能够保持较长时间发光。

[0039] 进一步地,本发明样品仓室单元设有透明材质的第一导热面和第二导热面,通过对其内部的样品液体加热使细胞外囊泡产生热泳效应并向低温处移动,同时,温度升高后样品液体会产生热对流并使细胞外囊泡聚积在指定位置,以此放大细胞外囊泡的光信号,这样,在对光参量进行检测的时候能够更加准确的观测到细胞外囊泡光参量的具体数值,进一步提高了所述检测系统的检测精度。

[0040] 进一步地,本发明所述检测系统使用热泳效应和热对流效应聚积细胞外囊泡,因此,所述检测系统对所述样品仓室单元的尺寸没有具体限制。所述样品仓室单元中的样品液体用于装载细胞外囊泡和适体或抗体并能够使其产生热泳效应和对流,因此本检测系统在样品液体的选择上不作具体限制,只要所述样品液体能够在热对流效应下带动细胞外囊泡移动并聚积即可。进一步地,所述细胞外囊泡与适体或抗体通过特异性结合的方式连接在一起,这样,光标记能够稳固的连接在细胞外囊泡上,在细胞外囊泡聚积时,也能够更加准确地将细胞外囊泡的光参量观测出来,进一步提高了所述检测系统的检测精度。细胞外囊泡在热泳效应下受到的力与其直径平方成正比,而与细胞外囊泡数量无关,因此,在检测时只需要少量的血样即可完成,对于细胞外囊泡仅需0.1微升的样本用量,并且无需对样品进行前置处理。

[0041] 进一步地,所述样品仓室单元在被加热时,只要所述第一导热面和第二导热面之间存在温差,就能够使样品仓室单元内产生热泳效应和热对流并将带有光标记的细胞外囊泡聚积至指定位置。所述检测系统中仅需对聚积的细胞外囊泡光参量进行检测,无需使用其他特殊仪器,在不影响检测系统检测精度的情况下,节约了检测装置的成本。

[0042] 进一步地,所述检测系统中设有数据采集单元,其能够从采集到的蛋白表达图谱中提取指定的光参量,并将其带入无加权求和模型模型中以计算细胞外囊泡表达蛋白的无加权表达强度,通过将直观的图像转换为具体的数字,进一步提高了所述检测系统的检测精度。

[0043] 进一步地,所述检测系统中设有数据采集单元,其能够从采集到的蛋白表达图谱中提取指定的光参量,通过将直观的图像转换为具体的数字,进一步提高了所述检测系统的检测精度。

[0044] 进一步地,所述检测系统能够针对不同癌症中高表达蛋白选择对应的适体或抗体对其进行标记,以此测得对应表达蛋白的丰度图谱并计算出表达强度,这样,所述检测系统

不仅能够对PD-L1受体进行检测,同时还能对其他癌症进行快速而准确地检测,如:肺癌、胰腺癌、大肠癌、胃癌、前列腺癌、头颈部癌、皮肤癌、肾癌、睾丸癌、甲状腺癌、膀胱癌、子宫癌、阴道癌、子宫内膜癌、卵巢癌、食道癌、口腔癌、唾液腺癌、喉癌、腹膜癌、鼻癌、喉癌、输卵管癌、肾母细胞瘤、淋巴瘤、胆管癌,以及秋千肉瘤、滑膜肉瘤、髓母细胞瘤、滋养层细胞瘤、胶质瘤、成胶质细胞瘤、胆脂瘤、软骨肉瘤、室管膜瘤、神经鞘瘤、神经瘤、横纹肌肉瘤。

附图说明

- [0045] 图1为本发明基于热泳对PD-L1受体的检测系统的结构图;
- [0046] 图2为本发明基于利用化学发光对PD-L1受体的检测系统的结构图;
- [0047] 图3为本发明利用单色器检测细胞外囊泡样本吸光度的原理图;
- [0048] 图4为本发明基于热泳利用化学发光对PD-L1受体的检测系统对不同种类癌症患者以及健康待测者进行检测后得出的PD-L1受体表达强度分布对比图。

具体实施方式

[0049] 为了使本发明的目的和优点更加清楚明白,下面结合实施例对本发明作进一步描述;应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用于解释本发明,并不用于限定本发明。

[0050] 以下结合附图,对本发明上述的和另外的技术特征和优点作更详细的说明。

[0051] 下面参照附图来描述本发明的优选实施方式。本领域技术人员应当理解的是,这些实施方式仅仅用于解释本发明的技术原理,并非在限制本发明的保护范围。

[0052] 需要说明的是,在本发明的描述中,术语“上”、“下”、“左”、“右”、“内”、“外”等指示的方向或位置关系的术语是基于附图所示的方向或位置关系,这仅仅是为了便于描述,而不是指示或暗示所述装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作,因此不能理解为对本发明的限制。

[0053] 此外,还需要说明的是,在本发明的描述中,除非另有明确的规定和限定,术语“安装”、“相连”、“连接”应做广义理解,例如,可以是固定连接,也可以是可拆卸连接,或一体地连接;可以是机械连接,也可以是电连接;可以是直接相连,也可以通过中间媒介间接相连,可以是两个元件内部的连通。对于本领域技术人员而言,可根据具体情况理解上述术语在本发明中的具体含义。

[0054] 系统实施例一

[0055] 本发明实施例为基于热泳细胞外囊泡的PD-L1受体检测系统,请参阅图1所示,其为本发明基于热泳细胞外囊泡检测的PD-L1受体检测系统实施例一的结构示意图,本实施例的系统包括加热单元1、样品仓室单元2、信号放大单元3和信号处理单元4,其中,所述加热单元1设置在所述样品仓室单元2的上方,用以对所述样品仓室单元2内的样品加热;所述样品仓室单元2内装有样品液体,用以装载细胞外囊泡和带有荧光标记的适体;所述信号放大单元3设置在所述样品仓室单元2下方,用以放大所述荧光标记的荧光信号,所述信号处理单元4设置在所述信号放大单元3侧面,用以采集和记录所述放大后的荧光信号,并对荧光信号的光亮度、光强度和光波长参数中的一种或几种进行或获取,同时使用无加权模型对待测细胞外囊泡进行癌症病变程度的检测。

[0056] 具体而言,在基于热对PD-L1受体检测的检测系统工作前,先将细胞外囊泡和带有

荧光标记的适体放入样品仓室单元2,通过适体与细胞外囊泡中的PD-L1受体进行特异性结合,以将荧光标记在细胞外囊泡上。标记完成后,所述加热单元1开始对样品仓室单元2加热,样品仓室单元2受热后,其内部的样品液体开始产生热泳效应并发生对流,并将被标记的细胞外囊泡聚集在指定位置;聚集完成后,信号放大单元3会向细胞外囊泡聚集的位置发射对比光源,信号处理单元4会采集聚集的细胞外囊泡的相关信息,并对其进行相应的分析,通过光的光亮度、光强度、波长参数中的一种或几种获取。本领域的技术人员可以理解的是,本实施例基于热泳细胞外囊泡检测的PD-L1受体检测系统不仅可用于对细胞外囊泡进行聚集和检测,也可对细胞外囊泡或其他种类的微纳生物粒子进行检测,只要满足所述基于热泳细胞外囊泡检测的PD-L1受体检测系统能够达到其指定的工作状态即可。

[0057] 请继续参阅图1所示,本发明实施例加热单元1为一激光加热器,其设置在所述样品仓室单元2上方,用以对所述样品仓室单元2内部的样品液体进行加热,以在其内部产生圆形的加热区域。当细胞外囊泡被标记完成后,所述加热单元1对所述样品仓室单元2内部的样品液体进行加热,以将细胞外囊泡聚集起来。可以理解的是,所述加热单元1的加热方式并不仅限于激光照射,且激光照射的方向和功率的选择本实施例均不作具体限制,只要满足所述加热单元1能够使所述样品仓室单元2内部产生温差以汇聚细胞外囊泡即可。

[0058] 请继续参阅图1所示,本发明实施例所述样品仓室单元2设置在所述加热单元1下方,用以盛装含有细胞外囊泡和适体的样品液体,包括第一导热面21、第二导热面22和垫片23;其中所述垫片23设置在所述第一导热面21下方并与其相接触,用以盛装样品液体,所述第二导热面22设置在所述垫片23下方,用以与所述第一导热面21一同将所述垫片23内部的样品液体密封。当所述加热单元1对所述样品仓室单元2进行加热时,激光会依次穿过所述第一导热面21和第二导热面22并对其进行加热,由于样品液体受热升温,在加热后所述细胞外囊泡温度也会升高,此时细胞外囊泡会产生热泳效应并向温度较低的第一导热面21和第二导热面22方向移动,由于所述第一导热面21与第二导热面22的导热性不同,在加热后所述第一导热面21加热点处的温度会高于第二导热面22加热点处的温度并使样品液体产生温度差,样品液体从而在样品仓室单元2中沿低温处向高温处方向产生热对流,使样品中细胞外囊泡迁移并聚积到所述第二导热面22处。可以理解的是,本实施例所述样品仓室单元2可以设置在所述加热单元1的下方、上方、左方或右方,只要所述加热单元1能够对所述样品仓室单元2加热而使其内部的样品液体升高温度即可。

[0059] 具体而言,本发明所述第一导热面21为玻璃片,其设置在所述垫片23上方,用以密封所述垫片23内部的样品液体并与所述加热单元1一同对样品液体加热。当所述加热单元1的激光穿过所述第一导热面21时,其会对所述第一导热面21的中心处进行加热,并提高加热处的温度,温度提高后,所述第一导热面21会将热量传递至所述垫片23中的样品液体,并使样品液体产生对流,以聚积细胞外囊泡。可以理解的是,所述第一导热面21的材料可以为玻璃、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚二甲基硅氧烷(PDMS)、蓝宝石或其他种类的透明材料,只要满足所述第一导热面21能够受热升温即可。

[0060] 具体而言,本发明所述第二导热面22为导热性高于所述第一导热面21的玻璃片,其设置在所述垫片23下方,用以密封所述垫片23内部的样品液体并与所述加热单元1一同对样品液体加热。当所述加热单元1的激光穿过所述第二导热面22时,其会对所述第二导热面22的中心处进行加热,并提高加热处的温度,温度提高后,所述第二导热面22会将热量传

递至所述垫片23中的样品液体,由于所述第二导热面22的导热性高于所述第一导热面21,在所述加热单元1加热完成后,所述第二导热面22的温度会小于所述第一导热面21的温度,在所述垫片23内产生温差,并使样品液体产生对流,以聚积细胞外囊泡。可以理解的是,所述第二导热面22的材料可以为玻璃、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚二甲基硅氧烷(PDMS)、蓝宝石或其他种类的透明材料,只要满足所述第二导热面22能够受热升温且其温度低于样品液体中心温度即可。

[0061] 具体而言,所述垫片23为一设有通孔的圆片,其设置在所述第一导热面21和第二导热面22之间,用以装载样品液体和聚积细胞外囊泡。当所述加热单元1对所述样品仓室单元2进行加热时,加热激光的焦点会位于所述垫片内部的样品液体处,通过对样品液体加热使样品液体内部的细胞外囊泡产生热泳效应并向所述第二导热面22聚集,同时因为所述第一导热面21和第二导热面22之间的温差,样品液体开始产生对流并将细胞外囊泡聚集在所述第二导热面22的激光照射处。可以理解的是,所述垫片23中的样品液体材质可以为血浆、血清或任意形式的血液或其处理加工的衍生样本,只要满足所述样品液体能够装载细胞外囊泡和适体并能够使其产生热泳效应和对流即可。

[0062] 请继续参阅图1所示,本发明实施例所述信号放大单元3设置在所述样品仓室单元2下方,用以照射所述第二导热面22中聚集的细胞外囊泡并将所述细胞外囊泡中的荧光信号放大,包括物镜31、采集反光镜32、放大反光镜33和观测光源34。其中,所述物镜31设置在所述第二导热面22下方,用以收集所述带有荧光标记细胞外囊泡的荧光信号,所述采集反光镜32设置在所述目镜31下方,用以将放大的荧光信号反射给所述信号处理单元4,所述放大反光镜33设置在所述采集反光镜32下方,用以将所述观测光源34中的光线反射至所述物镜31中,所述观测光源34设置在所述放大反光镜33右侧,用以提供放大荧光信号的光线。当所述信号放大单元开始工作时,所述观测光源34发射光线,通过所述放大反光镜33反射至所述物镜31,所述物镜31将光线照射至所述第二导热面22中的细胞外囊泡聚集处,并以此放大所述细胞外囊泡的荧光信号,放大完成后,所述信号处理单元4会使用所述采集反光镜32采集所述放大后的荧光信号,以此完成荧光信号的采集和处理。可以理解的是,所述信号放大单元3可以设置在所述样品仓室单元2的上方、下方、左方或右方,只要满足其能够对样品仓室内的荧光信号进行采集即可。

[0063] 具体而言,本发明所述物镜31设置在所述第二导热面22细胞外囊泡聚集处的下方,用以收集所述细胞外囊泡中的荧光信号,当所述观测光源34的光线照射至物镜31时,物镜31会将光线照射至所述第二导热面22上,以此放大所述细胞外囊泡上的荧光信号。可以理解的是,所述物镜31的种类本实施例不作具体限制,只要满足所述物镜31能够达到其指定的工作状态即可。

[0064] 具体而言,本发明实施例所述采集反光镜32为一平面镜,其设置在所述物镜31下方并与物镜31呈45°夹角,用以反射所述放大后的荧光信号。当所述细胞外囊泡的荧光信号被放大后,所述采集反光镜32将荧光标记反射至所述信号处理单元4,以完成荧光信号的采集。可以理解的是,所述采集反光镜32的尺寸本实施例不作具体限制,只要满足所述采集反光镜32能够将荧光信号完整的反射至所述信号采集单元即可。

[0065] 请继续参阅图1所示,本发明实施例所述信号处理单元4包括一CCD相机,其设置在所述采集反光镜32右侧,用以采集所述细胞外囊泡的荧光信号。当所述荧光信号被放大后,

所述采集反光镜32会将放大后的荧光信号反射至所述信号处理单元4中,所述信号处理单元4对荧光信号进行采集和整理,形成单次检测的图谱,可以理解的是,信号处理单元4可以包括CDD相机,也可以为任何能够探测荧光信号的仪器,只要所述信号处理单元4能够通过所述信号放大单元3对带有荧光标记的细胞外囊泡进行拍照,获取信息即可。当然,所述信号处理单元4可以位于所述信号放大单元3的左侧、右侧、上侧或下侧,只要满足所述信号处理单元4能够通过信号放大单元3采集和处理荧光信号即可。

[0066] 本系统实施例检测系统在检测时通过现将荧光标记与适体相连,再将适体与待测细胞外囊泡一同孵育以将细胞外囊泡标上荧光标记,操作简单,易于执行,在使用本系统对多个待测者进行检测时,患者仅需要提供少量血样,就能够对患者的病情进行快速的诊断。

[0067] 系统实施例二

[0068] 本发明实施例为基于化学发光的细胞外囊泡检测系统,作为本发明的优选实施例,请参阅图2所示,其为本发明实施例基于热泳细胞外囊泡检测的PD-L1受体检测系统的结构示意图,本实施例的系统包括加热单元1、样品仓室单元2和信号处理单元4,该上述单元与上述实施例一相同。

[0069] 与上述实施例一不同的是,本发明的光标记采用化学发光标记方法,在使用基于热泳细胞外囊泡检测的PD-L1受体检测系统前,先将细胞外囊泡待测样品与标记有发光催化物的适体或抗体一同孵育,发光催化物可以为酶,通过适体或抗体与细胞外囊泡表达蛋白特异性结合将细胞外囊泡标记酶,标记完成后,将孵育完成的样本放入所述样品仓室单元2,并向所述样品仓室单元内部加入发光底物,酶催化发光底物并使其达到激发状态,并在其转化为基态时发出光信号。

[0070] 当所述基于热泳细胞外囊泡检测的PD-L1受体检测系统开始工作时,所述加热单元1对所述样品仓室单元2进行加热,使其内部的细胞外囊泡产生热泳效应而开始向温度低的一面移动,同时所述样品仓室单元的两侧温度不同使所述样品仓室单元2内部开始产生对流,并将细胞外囊泡聚积在指定位置,聚积完成后,所述信号处理单元3开始对细胞外囊泡的光信号进行采集,并得出所述细胞外囊泡表面表达蛋白的丰度图谱。请继续参阅图2所示,本发明实施例所述信号处理单元4设置在所述样品仓室单元2下方,用以对所述聚集的细胞外囊泡进行观测和采集。

[0071] 具体而言,在本实施例基于化学发光的细胞外囊泡检测体系中,所述标记酶可以为辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(ALP)或其他种类的标记酶;所述发光底物为鲁米诺(32氨基邻苯二甲酰肼)、异鲁米诺(42氨基邻苯二甲酰肼)或其他种类的衍生物,只要满足所述标记酶能够与细胞外囊泡发生反应并粘在细胞外囊泡表面,且所述发光底物能够与所述标记酶发生反应并发出光亮即可。

[0072] 本实施例与上述实检测系统施例一相比,加热单元1、样品仓室单元2的结构、原理和工作功能均相同,但由于本实施例使用化学反应产生的光对细胞外囊泡中的PD-L1受体进行标记,在标记完成后细胞外囊泡表面会保持有长时间的高亮光信号,因此本实施例不使用所述放大反光镜33和观测光源34对光信号进行放大也可对细胞外囊泡的光信号进行准确地观测和采集。

[0073] 本实施例检测系统在检测时先将抗体与细胞外囊泡一同孵育并使其互相连接,孵育完成后将细胞外囊泡与发光底物一同放入所述样品仓室单元2中,通过抗体中的发光催

化物催化发光底物使其达到激发态,并在其转化成基态时释放光能,以此在细胞外囊泡中的PD-L1受体标记光信号,同时,本实施例所述的化学反应为催化反应,发光催化物作为催化剂能够一直催化发光底物发生反应并持续产生光亮,这样,在检测时,所述细胞外囊泡能够保持长时间发光。

[0074] 进一步地,由于光信号能够长时间维持,故而无需对光信号进行二次放大,在采集光信号时,相比于所述系统实施例一,本实施例只需一次就能对光信号进行清晰准确的采集,节约了系统的检测时间,提高了检测效率。

[0075] 进一步地,在检测时,将标记完成的细胞外囊泡从孵育容器中转移到装有样品液体的样品仓室单元2中,这样一来,就排除了多抗抗体体发生反应并一同发光的现象,使得所述基于热泳细胞外囊泡利用化学检测的癌症检测系统在对细胞外囊泡进行检测时,在具有所述基于热泳细胞外囊泡检测的癌症检测系统优点的基础上,拥有高度的准确性。

[0076] 基于上述两种实施例而言,对于细胞外囊泡的光度的检测、及参量化,基于有加权 and/或无加权的计算方式获取,然后根据标准的蛋白质标志物浓度与光某种参量的标准函数关系,来确定癌变程度。如,通过对光强度、光亮度、光频率、特定波长吸光度下的样本浓度等光特性检测物理量进行判定。

[0077] 下面通过实施例进行说明。

[0078] 实施例1

[0079] 研究表明,几乎所有物种的细胞均能分泌细胞外囊泡,根据来源不同,细胞外囊泡可分为三类:外泌体、微泡和凋亡小体,其中,外泌体包含了复杂脂质、RNA和蛋白质。

[0080] 外泌体富含胆固醇和鞘磷脂,且其携带的mRNA成分可以进入细胞浆中并被翻译成蛋白质,不仅仅是mRNA,外泌体所转移的microRNA同样具有生物活性,在进入靶细胞后可以靶向调节细胞中mRNA的水平。

[0081] 综上所述,本实施例选用外泌体作为检测样本对PD-L1受体在不同细胞外囊泡中的表达强度进行检测。

[0082] PD-L1在多种癌症患者肿瘤中具有较高表达。本实施例选取4例黑色素瘤患者与2名健康志愿者,检测其血浆中细胞外囊泡的PD-L1表达,包括以下步骤:

[0083] 步骤1:从指定细胞中提取细胞外囊泡,并将其与带有荧光标记的适体一同孵育培养,使带有荧光标记的适体与细胞外囊泡表面的PD-L1受体进行特异性结合,以此将细胞外囊泡表面标记上光;

[0084] 步骤2:将所述步骤1中孵育完成的细胞外囊泡放入所述样品仓室单元2中;

[0085] 步骤3:当所述细胞外囊泡添加完成后,使用加热单元1对所述样品仓室单元2进行加热,并将激光的焦点设置在样品仓室单元2内部的样品液体上,加热后,样品液体中的细胞外囊泡会产生热泳效应,并向低温区域移动。与此同时,所述样品液体受热膨胀产生浮力,从而在所述样品仓室单元2内产生对流,对流的方向从周围指向样品仓室单元2的加热区域,将周围的细胞外囊泡汇聚在样品仓室单元2的低温一侧;

[0086] 步骤4:当所述细胞外囊泡聚积完成后,使用所述信号处理单元4对聚积的细胞外囊泡的荧光信号进行采集,采集完成后使用所述信号放大单元3对所述聚积细胞外囊泡进行进行光照,光照完成后使用所述信号处理单元4对所述聚积细胞外囊泡的荧光信号进行二次采集;

[0087] 步骤5:采集完成后,通过将照射前后采集的荧光信号参量化并相减,以得出单种细胞中分泌的细胞外囊泡PD-L1受体的丰度,通过计算将PD-L1受体的丰度转化成具体数值。

[0088] 步骤6:重复步骤1-步骤5,对同种细胞中的不同外泌体进行多次测量,得出PD-L1受体在一种细胞中表达强度的数值组;

[0089] 步骤7:计算完成后,重复步骤1-步骤6,分别得出PD-L1受体在不同种类细胞的外泌体的表达强度数值组;

[0090] 步骤8:对所属步骤7中的不同数值组进行统计计算,并绘制PD-L1受体表达强度分布对比图,根据分布对比图得出PD-L1受体在不同种类细胞的平均表达强度。

[0091] 其中,本实施例所述适体选择的是经体外筛选技术SELEX(指数富集配体系统进化)筛选出的能特异结合蛋白质或其他小分子物质的寡聚核苷酸片段。

[0092] 所述SELEX技术的基本思想是体外化学合成一个单链寡核苷酸库,用它与靶物质混合,混合液中存在靶物质与核酸的复合物,洗掉未与靶物质结合的核酸,分离与靶物质结合的核酸分子,以此核酸分子为模板进行PCR扩增,进行下一轮的筛选过程。通过重复的筛选与扩增,一些与靶物质不结合或与靶物质有低亲和力、中亲和力的DNA或RNA分子被洗去,而适配子(Adaptorprotein)即与靶物质有高亲和力的DNA或RNA从非常大的随机文库中分离出来,且纯度随SELEX过程的进行而增高,从P摩尔到n摩尔,最后占文库的大多数(>90%左右)。具有库容量大、适应范围广泛、高分辨率、高亲和力、筛选过程相对简便、快速、经济、实用性以及适配子体积小等特点。

[0093] 具体而言,本实施例的荧光标记适体为40碱基的单链DNA,在样品液体中的线团直径小于5纳米,而外泌体直径为30-150纳米;

[0094] 具体而言,本实施例的细胞外囊泡为细胞培养基上清,样品的孵育条件均为:2小时孵育时间、适体浓度0.1微摩尔每升、孵育温度室温。

[0095] 具体而言,本实施例所述加热单元采用1480nm波长的红外激光用于样品加热,功率为200毫瓦,焦点出激光光斑直径约200微米。在本实施例中,激光从上至下照射,样品仓室单元的上导热面采用明材质,如玻璃、PMMA、PDMS,下导热面采用导热性更好的蓝宝石,在底面形成低温区使细胞外囊泡热泳汇聚于底面。上导热面的厚度为1mm,下导热面的厚度为1mm,中间垫片以及样品仓室单元的高度均为240mm。

[0096] 当适体识别细胞外囊泡表达蛋白并与之结合时,适体上的荧光标记跟随细胞外囊泡被汇聚于激光光点下方的样品仓室单元底部区域,并产生增强荧光信号;当适体未识别细胞外囊泡表达蛋白时,游离的适体由于尺寸小不能汇聚,信号不增强。

[0097] 本实施例中,发光基团Cy5激发/发射波长为649/666nm,荧光信号被与光显微镜连接的CCD记录。通过CCD记录激光照射前后的荧光信号,通过分析激光照射前后的荧光信号,得出细胞外囊泡表面PD-L1受体的丰度。

[0098] 实施例2

[0099] PD-L1在多种癌症患者肿瘤中具有较高表达。本实施例选取4例黑色素瘤患者与2名健康志愿者,检测其血浆中细胞外囊泡的PD-L1表达,包括以下步骤:

[0100] 步骤1:从指定细胞中提取外泌体,并将其与带有发光催化物的抗体一同孵育培养,使带有发光催化物的抗体与外泌体表面的PD-L1受体进行特异性结合,以将抗体标记在

外泌体上；

[0101] 步骤2:将孵育后的外泌体样品放入所述样品仓室单元2,并加入发光底物,使发光底物与抗体上的发光催化物催化而达到激发状态,并在转化为基态过程中释放光能以使外泌体表面标记光信号。

[0102] 步骤3:使用加热单元1对所述样品仓室单元2进行加热,并将激光的焦点设置在样品仓室单元2内部的样品液体上,加热后,样品液体中的外泌体会产生热泳效应,并向低温区域移动。与此同时,所述样品液体受热膨胀产生浮力,从而在所述样品仓室单元2内产生对流,对流的方向从周围指向样品仓室单元2的加热区域,将周围的外泌体汇聚在样品仓室单元2的低温一侧；

[0103] 步骤4:利用所述信号处理单元4获取外泌体聚积后放大的光信号,通过分析光信号,得出单种细胞中外泌体PD-L1受体的丰度图；

[0104] 步骤5:采集完成后,通过将照射前后采集的荧光信号参量化并相减,以得出单种细胞中分泌的外泌体PD-L1受体的丰度,通过计算将PD-L1受体的丰度转化成具体数值。

[0105] 步骤6:重复步骤1-步骤5,对同种细胞的不同外泌体进行多次测量,得出PD-L1受体在一种细胞中表达强度的数值组；

[0106] 步骤7:计算完成后,重复步骤1-步骤6,分别得出PD-L1受体在不同种类细胞的外泌体表达强度数值组；

[0107] 步骤8:对所属步骤7中的不同数值组进行统计计算,并绘制PD-L1受体表达强度分布对比图,根据分布对比图得出PD-L1受体在不同种类细胞的平均表达强度。

[0108] 针对当前热泳系统,本实施例选用外泌体上待检测标志物作为抗原,抗体的作用由核酸适体实现,酶则链接在核酸适体上,发光底物在检测前加入至样本即可。

[0109] 具体而言,本实施例样品的孵育条件、系统中各部件材质的选用以及所述加热单元1的加热参数和方向均与所述实施例1中的条件相同。

[0110] 利用上述统计计算方法绘制的PD-L1受体表达强度分布对比图如图4所示。根据图4可得,本实施例结果显示4名癌症患者血液中细胞外囊泡具有显著高表达,相对于健康血样,PD-L1受体的平均表达强度要更高,说明检测细胞外囊泡PD-L1能够反映其癌细胞的表达情况。

[0111] 至此,已经结合附图所示的优选实施方式描述了本发明的技术方案,但是,本领域技术人员容易理解的是,本发明的保护范围显然不局限于这些具体实施方式。在不偏离本发明的原理的前提下,本领域技术人员可以对相关技术特征做出等同的更改或替换,这些更改或替换之后的技术方案都将落入本发明的保护范围之内。

[0112] 以上所述仅为本发明的优选实施例,并不用于限制本发明;对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

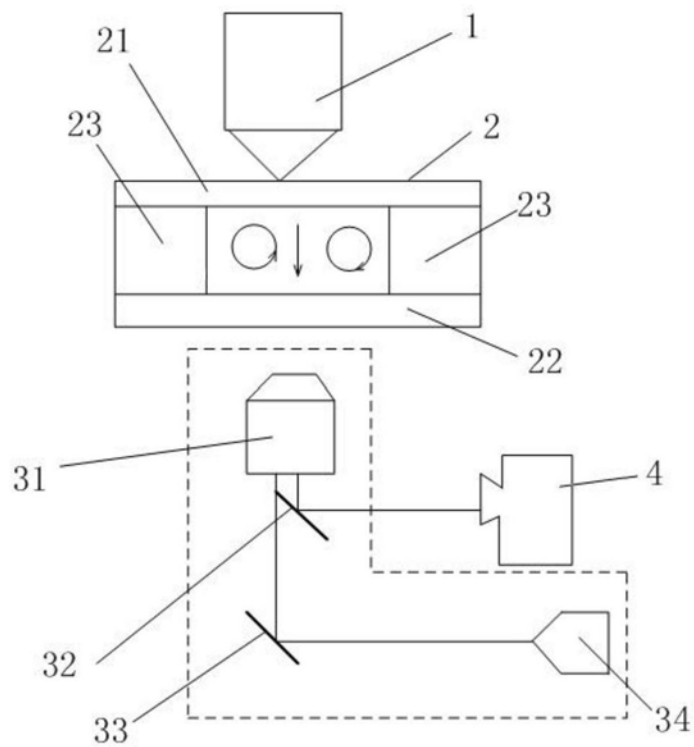


图1

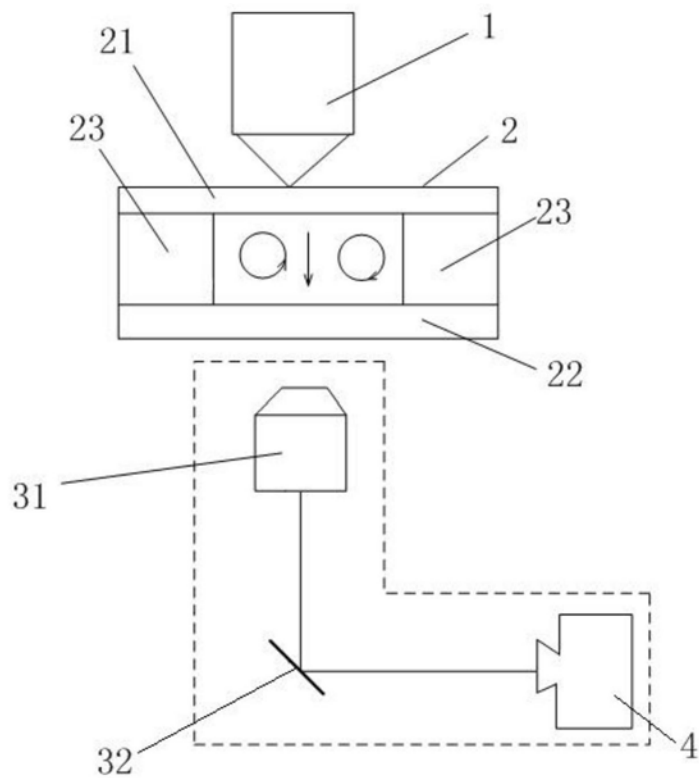


图2

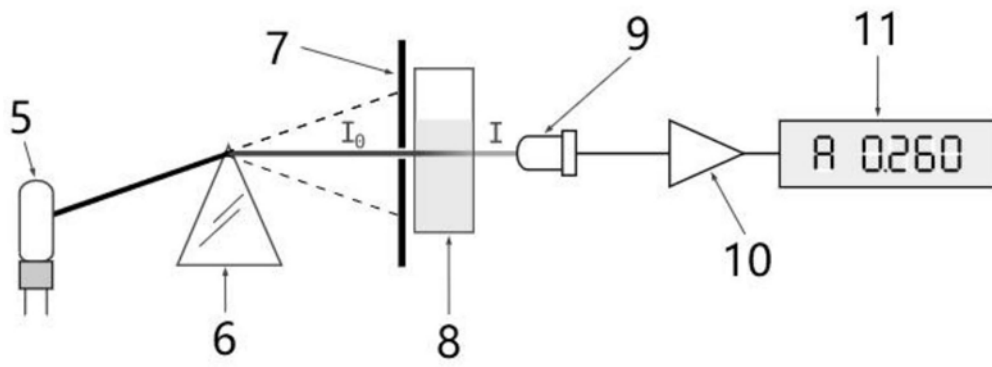


图3

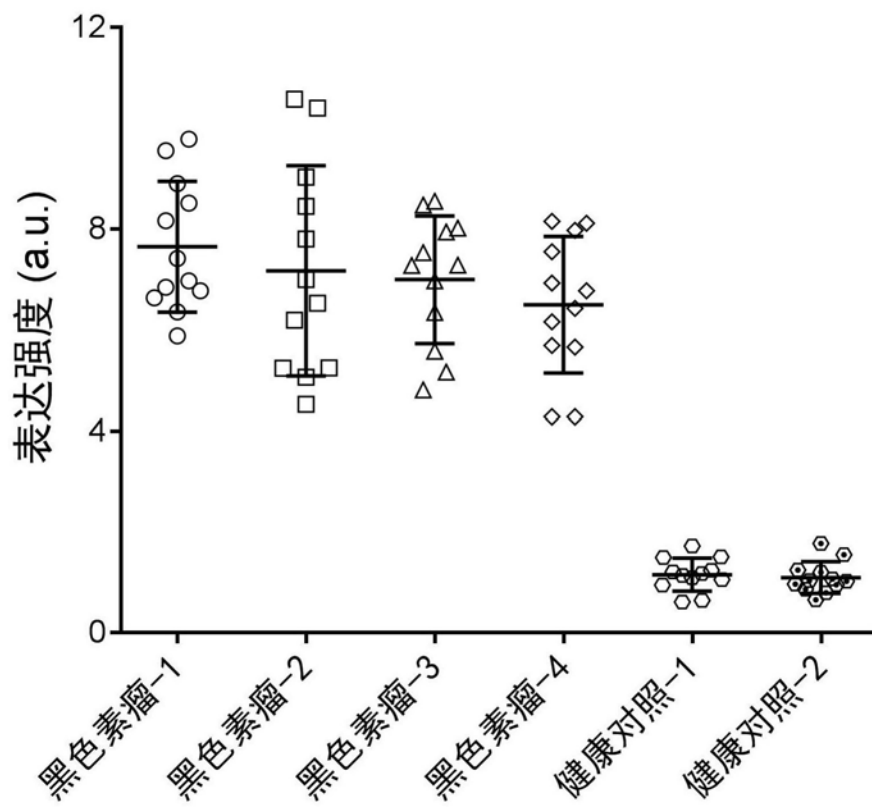


图4