



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108169199 B

(45)授权公告日 2020.07.24

(21)申请号 201810136615.5

(22)申请日 2018.02.09

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108169199 A

(43)申请公布日 2018.06.15

(73)专利权人 大连理工大学

地址 116024 辽宁省大连市高新园区凌工路2号

(72)发明人 肖义 李宁 张新富 陈令成

(74)专利代理机构 大连星海专利事务所有限公司 21208

代理人 杨翠翠

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

(56)对比文件

CN 103666458 A,2014.03.26,全文.

CN 102618060 A,2012.08.01,全文.

CN 106053405 A,2016.10.26,全文.

CN 105671082 A,2016.06.15,全文.

CN 101805526 A,2010.08.18,全文.

CN 1609600 A,2005.04.27,全文.

CN 106289927 A,2017.01.04,全文.

CN 103993088 A,2014.08.20,全文.

CN 106841613 A,2017.06.13,全文.

CN 104531828 A,2015.04.22,全文.

CN 105624192 A,2016.06.01,全文.

WO 2011143540 A1,2011.11.17,全文.

CN 106544317 A,2017.03.29,全文.

SU 1010591 A1,1983.04.07,全文.

WO 2010085259 A1,2010.07.29,全文.

EP 1269185 A2,2003.01.02,全文.

张新富.长波长氟硼吡咯发色团的设计与应用研究.《中国博士学位论文全文数据库》.2017,

于海波.比率型和细胞器定位型荧光探针的设计.《中国博士学位论文全文数据库》.2013,

丁煜宾等.比率型荧光探针的构建及其有害物质检测应用.《第十届全国化学生物学学术会议报告摘要集》.2017, (续)

审查员 白江波

权利要求书2页 说明书9页 附图3页

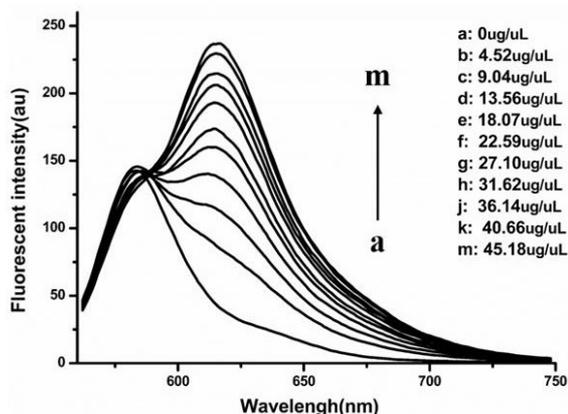
(54)发明名称

一种利用荧光比率进行外泌体快速定量的方法

(57)摘要

一种利用荧光比率进行外泌体快速定量的方法,其属于荧光检测的技术领域。该方法涉及到两种荧光染料,染料A是一种高度水溶性并且对膜结构没有亲和性的染料,作为实验过程中的内参。染料B是一种特异性免洗的膜染料,染料B可以与亲脂性的膜结构结合后会表现出强烈的发光性质,而在没有与亲脂性的膜结构结合的水环境中由于其疏水性而发生聚集而无荧光。本发明提供一种外泌体快速定量的方法,基于两种荧光染料的比率定量,成功实现了生物样品中外泌体的测定。该方法具有效率高,成本低,操作方便,测定结果准确性高等优点。有望在外泌体相

关研究中得到广泛的应用。该方法应用于细胞培养基、唾液、血清、尿液、乳液。



CN 108169199 B

[接上页]

(56)对比文件

E . VAN DER POL等.Innovation in detection of microparticles and exosomes.《Journal of Thrombosis and Haemostasis》.2013,

李玉静等.血清中胎盘来源外泌体的分离与鉴定.《医学研究生学报》.2015,

John R. Chevillet等.Quantitative and stoichiometric analysis of the.《PNAS》.2014,

赵贵芳.脐带间充质干细胞及其来源外泌体修复皮肤损伤的机制研究.《中国博士学位论文全文数据库》.2016,

Xinfu Zhang等.Photostable Bipolar Fluorescent Probe for Video Tracking Plasma.《ACS》.2014,

Xiaolin Zhang等.A novel imidazo[1,5-a]pyridine-rhodamine FRET system as an efficient ratiometric fluorescent probe for Hg²⁺ in living cells.《Dyes and Pigments》.2017,

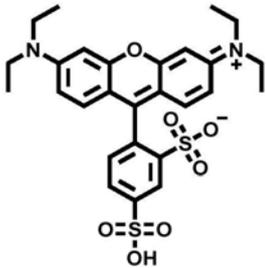
1. 一种利用荧光比率进行外泌体快速定量的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 配制染料母液

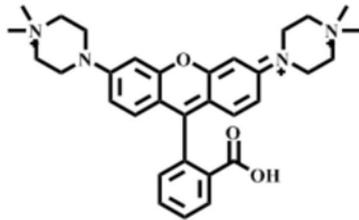
将染料A配制成100-200 μ M的DMSO的母液,将染料B配制成1-2mM的DMSO的母液;所述染料A为A-1、A-2或A-3,染料B为B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、B-6或B-7;

所述染料A和染料B的结构如下:

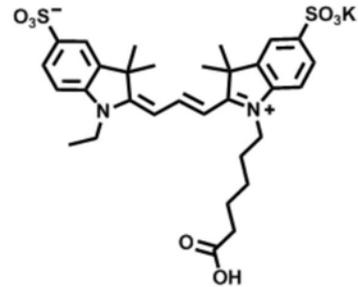
染料A:



A-1

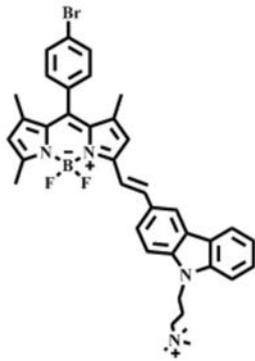


A-2

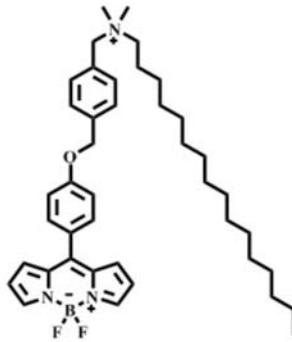


A-3

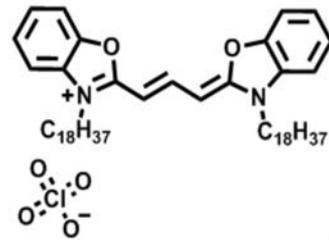
染料B:



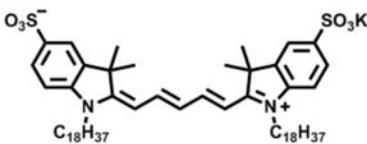
B-1



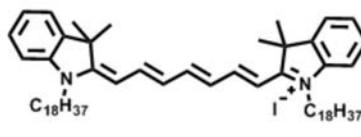
B-2



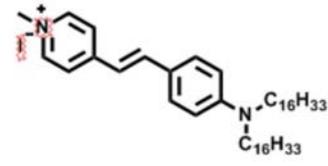
B-3



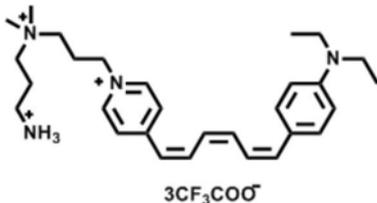
B-4



B-5



B-6



B-7

(2) 标准曲线的制备

在10-50 μ g/ μ L的浓度范围内,制备5-15份不同浓度的一系列外泌体标准液;向一系列外泌体标准液中加入染料A的母液和染料B的母液,使得染料A的浓度为100-200nM,染料B的

浓度为1-2 μ M;混匀室温下反应后,在相同波长激发下,测定染料A以及染料B的荧光光谱,以染料B与染料A最大发射处的荧光强度的比率值作为纵坐标,标准外泌体溶液的浓度作为横坐标,制作标准曲线;

(3) 待测外泌体样品的浓度

对待测外泌体的样品加入染料A的母液和染料B的母液,使得染料A的浓度为100-200nM,染料B的浓度为1-2 μ M;混匀室温下反应后,测定染料A以及染料B的荧光光谱,得到染料B与染料A最大发射处的荧光强度的比率值,带入标准曲线方程,得到待测外泌体样品的浓度。

2. 根据权利要求1所述的一种利用荧光比率进行外泌体快速定量的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 荧光染料母液的配制

染料A母液的配制:配制染料A-1的DMSO母液100 μ M,

染料B母液的配制:配制染料B-1的DMSO母液1mM,

(2) 标准曲线的制备

分别取外泌体标准液0、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250 μ L,依次配成浓度为0、4.52、9.04、13.56、18.07、22.59、27.10、31.62、36.14、40.66、45.18 μ g/ μ L外泌体标准液;分别加入染料A-1母液,使染料A-1溶液的浓度为100nM;加入染料B-1母液,使染料B-1溶液的浓度为1 μ M;震荡均匀后室温下反应10min,测定染料A-1和染料B-1的荧光光谱;染料B-1在615nm处的的荧光强度与染料A-1在584nm处的荧光强度的比率值作为纵坐标,外泌体标准液浓度作为横坐标制作标准曲线,得到标准曲线方程为: $y = 0.0315x + 0.4824$, $R^2 = 0.965$,其中x为10-50 μ g/ μ L;

(3) 外泌体样品的测定

取待测外泌体样品,依次加入染料A-1母液,使染料A-1溶液的浓度为100nM;加入染料B-1母液,使染料B-1溶液的浓度为1 μ M;震荡均匀后室温下反应10min,测定染料A-1和染料B-1的荧光光谱;计算出染料B-1在615nm处的的荧光强度与染料A-1在584nm处的荧光强度的比率值,根据荧光比率值带入标准曲线得到待测外泌体样品的浓度。

3. 根据权利要求1所述的一种利用荧光比率进行外泌体快速定量的方法,其特征在于:该方法应用于细胞培养基、唾液、血清、尿液、乳液。

一种利用荧光比率进行外泌体快速定量的方法

技术领域

[0001] 本发明具体涉及一种利用荧光比率进行外泌体快速定量的方法,其属于荧光检测的技术领域。

背景技术

[0002] 外泌体是细胞经过“内吞-融合-外排”过程而形成的细胞外小囊泡。直径为30~150nm的脂质双分子层结构囊泡。它作为一种重要的细胞间信息传递分子及遗传物质传递载体,外泌体内含有多种蛋白质和RNA等物质,广泛分布于人体血液、尿液、唾液等体液中以及肿瘤细胞培养液中。肿瘤细胞分泌的外泌体可以促进肿瘤血管生成,也可以通过调控肿瘤微环境来影响肿瘤的生长与转移,外泌体在肿瘤的发展中发挥重要作用。在外泌体相关研究中,对分离纯化的外泌体进行快速准确定量显示的非常重要。

[0003] 目前对外泌体定量的方法主要有通过测外泌体总蛋白含量来定量外泌体的BCA蛋白定量法和借助纳米颗粒跟踪分析仪 (NTA) 进行外泌体定量以及借助于外泌体膜上的标志性蛋白如CD63, CD9类四跨膜蛋白进行的蛋白免疫定量。外泌体的BCA蛋白定量法首先要把分离纯化的外泌体进行裂解,让外泌体内含有的全部蛋白以及膜上的蛋白释放出来,二价铜离子在碱性的条件下,可以被蛋白质还原成一价铜离子,一价铜离子和BCA工作液相互作用产生敏感的颜色反应。两分子的BCA工作液螯合一个铜离子,形成紫色的反应复合物。该复合物在560nm显示强烈的吸光性,吸光度和蛋白浓度在广泛范围内有良好的线性关系,根据吸光值可以推算出蛋白浓度,从而得出外泌体的量。现阶段分离纯化外泌体的方法,主要有超速离心以及各种商业化试剂盒,得到的外泌体残留有蛋白质,尤其利用商业化试剂盒分离的外泌体残留更多的蛋白,用此方法定量的外泌体的量不太准确。纳米颗粒跟踪分析 (NTA) 定量法是利用纳米颗粒跟踪分析技术可以实时地对悬浮液中的颗粒进行逐个的直接成像和观察,并用视频摄像机捕获所产生的散射光。通过跟踪单个颗粒在二维平面上的位置变化来确定颗粒的扩散情况。纳米颗粒跟踪分析仪 (NTA) 可提供高分辨率的粒度分布图表和粒子浓度信息。该定量方法的缺点是设备比较昂贵,实验室通用性比较低。外泌体免疫定量方法主要包括蛋白免疫印迹 (WB),流式细胞法 (FACS) 以及商业化ELISA试剂盒。这种定量方法存在实验操作繁琐,实验仪器昂贵等问题。并且常用的外泌体标志性蛋白相对含量在不同类型的外泌体中有所不同,所以外泌体的免疫定量法结果也不够准确。综上所述,快捷,准确,高效的外泌体定量方法有待开发。本专利中细胞培养基、唾液、血清、尿液、乳液等生物样本中外泌体的分离纯化采用超速离心的方法参考文献报道 (Nature, 2015, 523 (7559), 177-182)。

发明内容

[0004] 为解决现有技术中存在的问题,本发明提供一种借助于荧光比率进行外泌体快速定量的方法,此方法具有高效,准确度高,成本低和易操作等特点。

[0005] 本发明采用的技术方案为:一种利用荧光比率进行外泌体快速定量的方法,包括

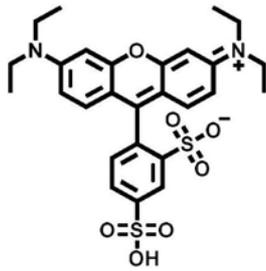
以下步骤:

[0006] (1) 配制染料母液

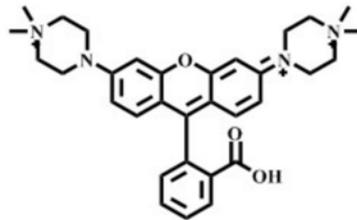
[0007] 将染料A配制成100-200 μ M的DMSO的母液,将染料B配制成1-2mM的DMSO的母液;所述染料A为A-1、A-2或A-3,染料B为B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、B-6或B-7;

[0008] 所述染料A和染料B的结构如下:

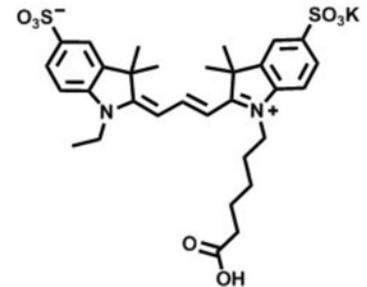
[0009] 染料A:



A-1

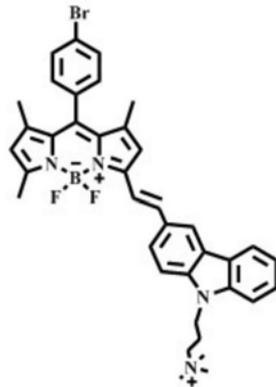


A-2

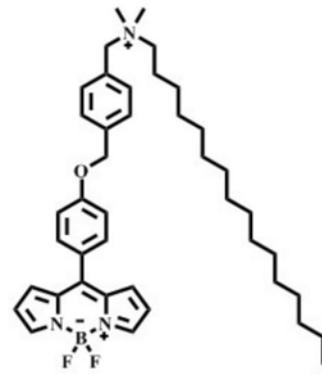


A-3

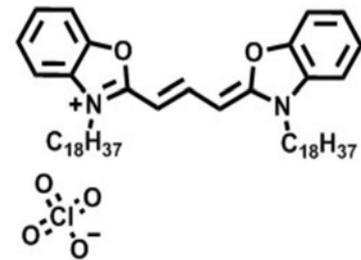
[0011] 染料B:



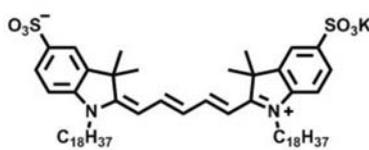
B-1



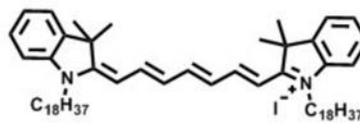
B-2



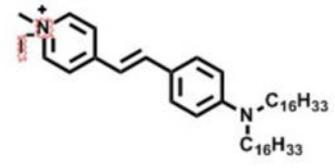
B-3



B-4

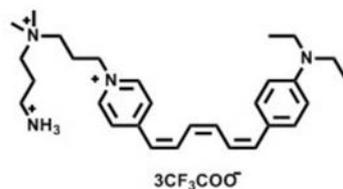


B-5



B-6

[0013]



B-7

[0014] 高纯度外泌体标准液的制备

[0015] 参考文献报道的超速离心的方法提取纯化外泌体,处理30mLMCF-7细胞培养液,用

过0.22 μ m的PBS溶液溶解外泌体沉淀,通过100KD超滤管多次PBS洗涤除去残留的蛋白质。最后加入过0.22 μ m的PBS溶液溶解外泌体沉淀物获得外泌标准液。通过外泌体BCA蛋白定量法对外泌体标准液进行定量。

[0016] BCA蛋白定量法标准曲线的制作:

[0017] 依次取标准BSA蛋白溶液(0.5 μ g/ μ L) 0、1、2、4、8、12、16、20 μ L配成浓度为0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μ g/ μ L标准BSA样品,不够20 μ L的样品需要补加PBS溶液定容到20 μ L。加入200 μ LBCA工作液,37 $^{\circ}$ C放置30min,测得560nm处吸光值,制作BSA蛋白定量的标准曲线。取一定量外泌体标准液,加入一定量的裂解液,震荡均匀后室温放置15min后,按照上述步骤测定560nm处吸光值。根据标准曲线和使用的标准液体积得到高纯度外泌体标准液浓度为0.1807 μ g/ μ L。它可以作为后面实验所需的外泌体标准液。

[0018] (2) 标准曲线的制备

[0019] 在10-50 μ g/ μ L的浓度范围内,制备5-15份不同浓度的一系列外泌体标准液;向一些列外泌体标准液中加入染料A的母液和染料B的母液,使得染料A的浓度为100-200nM,染料B的浓度为1-2 μ M;混匀室温下反应后,测定染料A以及染料B的荧光光谱,以染料B与染料A最大发射处的荧光强度的比率值作为纵坐标,标准外泌体溶液的浓度作为横坐标,制作标准曲线;

[0020] (3) 待测外泌体样品的浓度

[0021] 向待测外泌体的样品加入加入染料A的母液和染料B的母液,使得染料A的浓度为100-200nM,染料B的浓度为1-2 μ M;混匀室温下反应后,测定染料A以及染料B的荧光光谱,得到染料B与染料A最大发射处的荧光强度的比率值,带入标准曲线方程,得到待测外泌体样品的浓度。

[0022] 进一步,步骤(3)中待测外泌体的样品测得的染料B与染料A最大发射处的荧光强度的比率值在0-2之间;若比率值不在0-2之间,需要对待测外泌体的样品进行稀释,使得比率值在0-2之间,根据比率值和标准方程得到样品稀释后的浓度,再根据稀释倍数得到待测外泌体样品的浓度。

[0023] 一种利用荧光比率进行外泌体快速定量的方法,包括以下步骤:

[0024] (1) 荧光染料母液的配制

[0025] 染料A母液的配制:配制染料A-1的DMSO母液100 μ M。

[0026] 染料B母液的配制:配制染料B-1的DMSO母液1mM。

[0027] (2) 标准曲线的制备

[0028] 分别取外泌体标准液0、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250 μ L,依次配成浓度为0、4.52、9.04、13.56、18.07、22.59、27.10、31.62、36.14、40.66、45.18 μ g/ μ L外泌体标准液;分别加入染料A-1母液,使染料A-1溶液的浓度为100nM;加入染料B-1母液,使染料B-1溶液的浓度为1 μ M;震荡均匀后室温下反应10min,测定染料A-1和染料B-1的荧光光谱;染料B-1在615nm处的的荧光强度与染料A-1在584nm处的荧光强度的比率值作为纵坐标,外泌体标准液浓度作为横坐标制作标准曲线,得到标准曲线方程为: $y=0.0315x+0.4824$, $R^2=0.965$,其中x为0-50 μ g/ μ L;

[0029] (3) 外泌体样品的测定

[0030] 取待测外泌体样品,依次加入染料A-1母液,使染料A-1溶液的浓度为100nM;加入

染料B-1母液,使染料B-1溶液的浓度为 $1\mu\text{M}$;震荡均匀后室温下反应 10min ,测定染料A-1和染料B-1的荧光光谱;计算出染料B-1在 615nm 处的荧光强度与染料A-1在 584nm 处的荧光强度的比率值,根据荧光比率值带入标准曲线得到待测外泌体样品的浓度。

[0031] 该方法涉及到由两类荧光染料混合溶液形成的试剂盒,利用两种染料的荧光强度比率值对外泌体进行定量探测。其中,染料A作为外泌体测量的作为参比染料,是一种高度水溶性染料,其与外泌体膜无亲合力,在待测外泌体溶液中的荧光强度保持恒定;染料B作为探测染料,它是一种特异性的膜染料,其荧光强度随外泌体浓度增加而增强;染料A和染料B的荧光发射需要在相同波长下激发,以确保两种染料荧光强度比值不受不同激发光源的影响。根据此方法,试剂盒染料混合溶液配方如下:染料A可以为A-1,A-2和A-3的任意一种,浓度范围 $100\text{--}200\mu\text{M}$;染料B可以为B-1,B-2,B-3,B-4,B-5,B-6,B-7中的任意一种,浓度范围在 $1\text{--}2\text{mM}$ 。定量标准曲线的测定方法为:上述试剂盒加入到标准外泌体溶液中,混匀后在室温下染色十分钟,通过测定溶液的荧光光谱,以染料B与染料A最大发射处的荧光强度的比率值($R_{B/A}$)作为纵坐标,标准外泌体溶液的浓度作为横坐标,制作标准曲线后。外泌体定量检测过程:将待测外泌体的样品稀释合适浓度后测定染料B与染料A最大发射处的荧光强度的比率值,根据定量标准曲线,确定待测外泌体样品的浓度。本发明的方法和试剂盒对于来源于细胞培养基、唾液、血清、尿液、乳液等液体生物样本的外泌体都适用。

[0032] 本发明的有益效果为:该方法涉及到两种荧光染料,染料A是一种高度水溶性并且对膜结构没有亲和性的染料,作为实验过程中的内参。染料B是一种特异性免洗的膜染料,染料B可以与亲脂性的膜结构结合后会表现出强烈的发光性质,而在没有与亲脂性的膜结构结合的水环境中由于其疏水性而发生聚集而无荧光。本发明提供一种外泌体快速定量的方法,基于两种荧光染料的比率定量,成功实现了生物样品中外泌体的测定。该方法具有效率高,成本低,操作方便,测定结果准确性高等优点,有望在外泌体相关研究中得到广泛的应用。

附图说明

[0033] 图1是实施例1染料A-1和染料B-1随外泌体标准液浓度变化的荧光光谱图。

[0034] 图2是实施例1外泌体荧光比率定量法标准曲线。

[0035] 图3是实施例2、实施例3、实施例4及实施例5外泌体荧光比率定量法标准曲线。A:实施例2外泌体荧光比率定量法标准曲线,B:实施例3外泌体荧光比率定量法标准曲线,C:实施例4外泌体荧光比率定量法标准曲线,D:实施例5外泌体荧光比率定量法标准曲线。

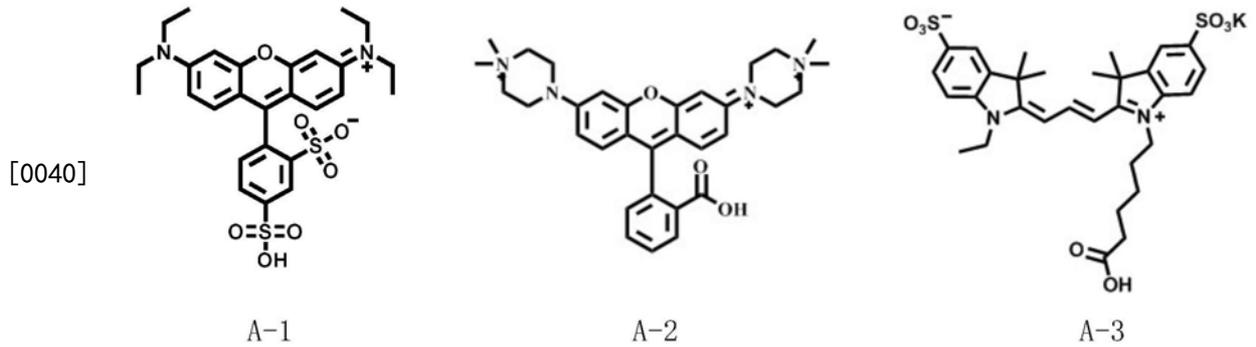
具体实施方式

[0036] 染料A和染料B的化学结构式

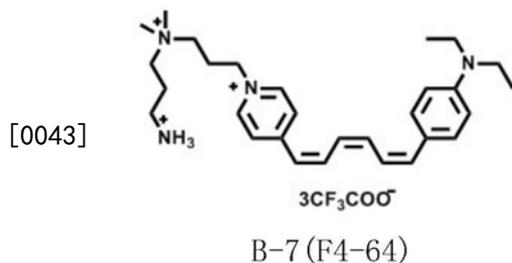
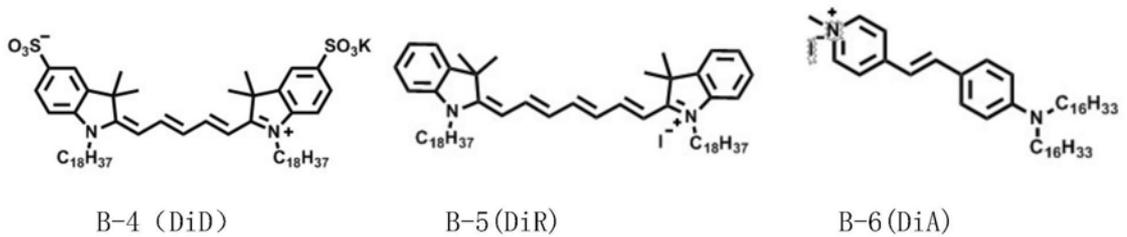
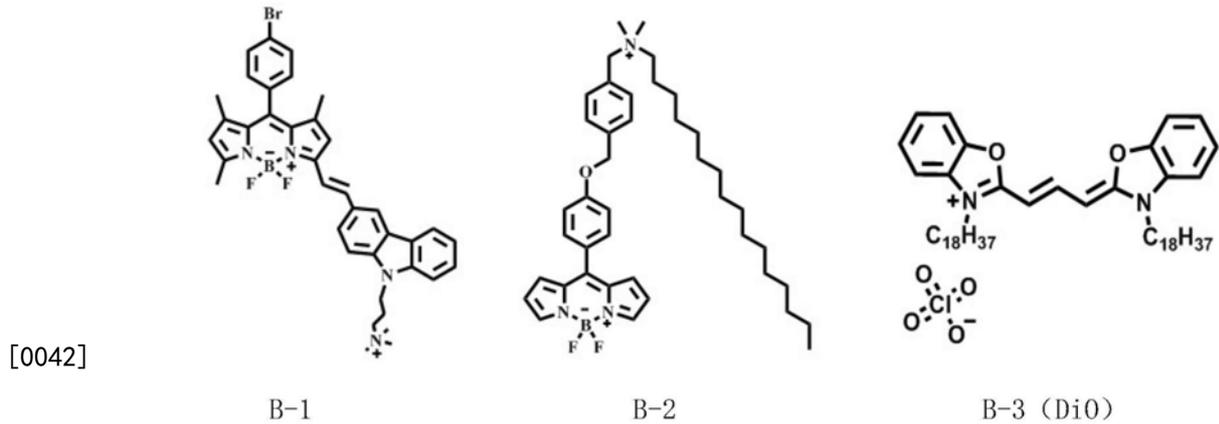
[0037] 染料A:A-1:磺酰罗丹明A-2:吖啶罗丹明A-3:磺酰CY3

[0038] 染料B:B-1:膜染料Mem-SQAC B-2:膜染料Mem-BDP B-3,B-4,B-5,B-6,B-7分别是商业化的细胞膜染料DiO,DiD,DiR,DiA,F4-64。

[0039] 染料A:



[0041] 染料B:



[0044] 高纯度外泌体标准液的制备

[0045] 参考文献报道的超速离心的方法提取纯化外泌体,处理30mLMCF-7细胞培养液,用过0.22 μ m的PBS溶液溶解外泌体沉淀,通过100KD超滤管多次PBS洗涤除去残留的蛋白质。最后加入过0.22 μ m的PBS溶解外泌体沉淀物获得外泌标准液。通过外泌体BCA蛋白定量法对外泌体标准液进行定量。

[0046] BCA蛋白定量法标准曲线的制作:

[0047] 依次取标准BSA蛋白溶液(0.5 μ g/ μ L) 0、1、2、4、8、12、16、20 μ L配成浓度为0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μ g/ μ L标准BSA样品,不够20 μ L的样品需要补加PBS溶液定容到20 μ L。加入200 μ LBCA工作液,37 $^{\circ}$ C放置30min,测得560nm处吸光值,制作BSA蛋白定量的标准

曲线。取一定量外泌体标准液,加入一定量的裂解液,震荡均匀后室温放置15min后,按照上述步骤测定560nm处吸光值。根据标准曲线和使用的体外泌体标准液体积得到高纯度外泌体标准液浓度为0.1807ug/uL。它可以作为后面实验所需的外泌体标准液。

[0048] 实施例1来源于HeLa细胞培养液中外泌体浓度测定

[0049] 1、来源于HeLa细胞培养液中的外泌体制备

[0050] 参考文献报道的超速离心的方法进行HeLa细胞培养液中外泌体的分离纯化。参考文献报道的超速离心的方法进行外泌体的分离纯化,大致实验流程如下所述。HeLa细胞培养在DMEM培养基中,该培养基含有10%去除外泌体的胎牛血清,1%的青霉素和链霉素。用75cm²细胞培养瓶在含5%的CO₂培养箱中37℃培养至80%汇合度,收集HeLa细胞培养基15mL,以4℃,2000g离心10分钟以除去细胞碎片,然后收集上清过0.22μm过滤器,上清液以4℃,100000g超速离心2h。保留沉淀物,用PBS洗涤,4℃下100000g再次离心2h。最后弃去上清液,将外泌体沉淀悬浮在500μLPBS溶液中,-80℃保存备用。

[0051] 2、试剂盒染料A、B混合溶液配制

[0052] 配制染料A和染料B的混合DMSO母液,在此次定量中选用染料A为A-1,染料B为B-1。染料A的DMSO母液浓度为100μM,染料B的DMSO母液浓度为1mM。染料A和染料B最终使用浓度分别为100nM,1μM。

[0053] 3. 荧光比率定量法标准曲线的制作

[0054] 分别取外泌体标准液0、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250μL,依次配成浓度为0、4.52、9.04、13.56、18.07、22.59、27.10、31.62、36.14、40.66、45.18μg/μL外泌体标准液。加过0.22μm膜的PBS溶液补足到终体积为2mL。分别加入选定的染料A-1(100μM)和选定的染料B-1(1mM)混合母液,使染料A-1溶液的终浓度为100nM,使染料B-1溶液的终浓度为1μM。震荡均匀后室温下反应10min,测定染料A-1和染料B-1的荧光光谱。光谱图采用550nm激发,560nm-750nm采集如图1,从图中可以看出染料A-1的荧光强度不会随着外泌体标准液浓度的改变而变化,而染料B-1的荧光强度会随着外泌体标准液浓度增大而增强。以染料B-1荧光强度与染料A-1的荧光强度比率值作为纵坐标,外泌体标准液浓度作为横坐标制作标准曲线如图2,有比较好的线性关系。得到标准曲线方程为: $y = 0.0315x + 0.4824$, $R^2 = 0.965$,其中x为0-50ug/uL;

[0055] 4. 外泌体样品浓度的测定

[0056] 取一定量待测外泌体样品,加入过0.22μm膜的PBS溶液补足到终体积为2mL。依次加入1μL步骤3中选定的A-1(100μM)和选定的B-1(1mM)混合母液,使染料A-1溶液的终浓度为100-200nM,使染料B-1溶液的终浓度为1-2μM。震荡均匀后室温下反应10min,测定染料A-1和染料B-1的荧光光谱。根据染料A-1和染料B-1的荧光光谱图,计算出染料B-1在615nm处的荧光强度与染料A-1在584nm处的荧光强度的比率值,根据荧光强度的比率值以及样品稀释倍数参考标准曲线可以快速准确的得到待测外泌体样品的浓度。如果测试的结果不在标准曲线的线性范围内,则需要对样品进行适当稀释后,重复测定。

[0057] 实施例2来源于唾液中外泌体浓度测定

[0058] 1. 来源于唾液中的外泌体制备

[0059] 根据实施例1,超速离心的方法进行唾液中外泌体的分离纯化。

[0060] 2. 试剂盒染料A、B混合溶液配制

[0061] 配制染料A和染料B的混合DMSO母液,染料A为A-2,染料B为B-2。染料A的DMSO母液浓度为200 μ M,染料B的DMSO母液浓度为2mM。染料A和染料B最终使用浓度分别为200nM,2 μ M。

[0062] 3. 荧光比率定量法标准曲线的制作

[0063] 分别取外泌体标准液0、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250 μ L,依次配成浓度为0、4.52、9.04、13.56、18.07、22.59、27.10、31.62、36.14、40.66、45.18 μ g/ μ L外泌体标准液。加过0.22 μ m膜的PBS溶液补足到终体积为2mL。分别加入选定的染料A-2 (200 μ M) 和选定的染料B-2 (2mM) 混合母液,使染料A-2溶液的终浓度为200nM,使染料B-2溶液的终浓度为2 μ M。震荡均匀后室温下反应10min,测定染料A-2和染料B-2的荧光光谱。以染料B-2荧光强度与染料A-2的荧光强度比率值作为纵坐标,外泌体标准液浓度作为横坐标制作标准曲线,结果如图3中A所示。标准曲线的方程为: $y=0.03x+0.5077$, $R^2=0.983$,其中x为0-50 μ g/ μ L;

[0064] 4. 外泌体样品浓度的测定

[0065] 取一定量待测外泌体样品,加入过0.22 μ m膜的PBS溶液补足到终体积为2mL。依次加入1 μ L步骤3中选定的A-2 (200 μ M) 和选定的B-2 (2mM) 混合母液,使染料A-2溶液的终浓度为200nM,使染料B-2溶液的终浓度为2 μ M。震荡均匀后室温下反应10min,测定染料A-2和染料B-2的荧光光谱。根据染料A-2和染料B-2的荧光光谱图,计算出染料B-2的荧光强度与染料A-2的荧光强度的比率值。

[0066] 根据染料A-2和染料B-2荧光强度的比率值以及样品稀释倍数参考标准曲线可以快速准确的得到待测外泌体样品的浓度。如果测试的结果不在标准曲线的线性范围内,则需要对样品进行适当稀释后,重复测定。

[0067] 实施例3来源于人血清中外泌体浓度测定

[0068] 1、来源于人血清中的外泌体制备

[0069] 根据实施例1中描述,超速离心的方法进行人血清中外泌体的分离纯化。

[0070] 2、试剂盒染料A、B混合溶液配制

[0071] 配制染料A和染料B的混合DMSO母液,染料A为A-3,染料B为B-3。染料A的DMSO母液浓度为100 μ M,染料B的DMSO母液浓度为1mM。染料A和染料B最终使用浓度分别为200nM,2 μ M。在此次定量中选用

[0072] 3、荧光比率定量法标准曲线的制作

[0073] 分别取外泌体标准液0、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250 μ L,依次配成浓度为0、4.52、9.04、13.56、18.07、22.59、27.10、31.62、36.14、40.66、45.18 μ g/ μ L外泌体标准液。加过0.22 μ m膜的PBS溶液补足到终体积为2mL。分别加入1 μ L选定的染料A-3 (100 μ M) 和选定的染料B-3 (1mM) 混合母液,使染料A-3溶液的终浓度为200nM,使染料B-3溶液的终浓度为2 μ M。震荡均匀后室温下反应10min,测定染料A-3和染料B-3的荧光光谱。以染料B-3荧光强度与染料A-3的荧光强度比率值作为纵坐标,外泌体标准液浓度作为横坐标制作标准曲线,如图3中B所示。得到标准曲线方程为: $y=0.0292x+0.5228$, $R^2=0.984$,其中x为0-50 μ g/ μ L;

[0074] 4、外泌体样品浓度的测定

[0075] 取一定量待测外泌体样品,加入过0.22 μ m膜的PBS溶液补足到终体积为2mL。依次加入1 μ L步骤3中选定的A-3 (100 μ M) 和选定的B-3 (1mM) 混合母液,使染料A-3溶液的终浓度为200nM,使染料B-3溶液的终浓度为2 μ M。震荡均匀后室温下反应10min,测定染料A-3和染

料B-3的荧光光谱。根据染料A-3和染料B-3的荧光光谱图,计算出染料B-3的荧光强度与染料A-3的荧光强度的比率值。

[0076] 根据染料A-3和染料B-3荧光强度的比率值以及样品稀释倍数参考标准曲线可以快速准确的得到待测外泌体样品的浓度。如果测试的结果不在标准曲线的线性范围内,则需要对样品进行适当稀释后,重复测定。

[0077] 实施例4来源于尿液中外泌体浓度测定

[0078] 1、来源于尿液中的外泌体制备

[0079] 参考文献报道的超速离心的方法进行尿液中外泌体的分离纯化。

[0080] 2、试剂盒染料A,B混合溶液配制

[0081] 配制染料A和染料B的混合DMSO母液,染料A为A-3,染料B为B-4。染料A的DMSO母液浓度为200 μ M,染料B的DMSO母液浓度为2mM。染料A和染料B最终使用浓度分别为100nM,1 μ M。在此次定量中选用

[0082] 3、荧光比率定量法标准曲线的制作

[0083] 分别取外泌体标准液0、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250 μ L,依次配成浓度为0、4.52、9.04、13.56、18.07、22.59、27.10、31.62、36.14、40.66、45.18 μ g/ μ L外泌体标准液。加过0.22 μ m膜的PBS溶液补足到终体积为2mL。分别加入1 μ L选定的染料A-3(200 μ M)和选定的染料B-4(2mM)混合母液,使染料A-3溶液的终浓度为100nM,使染料B-4溶液的终浓度为1 μ M。震荡均匀后室温下反应10min,测定染料A-3和染料B-4的荧光光谱。以染料B-4荧光强度与染料A-3的荧光强度比率值作为纵坐标,外泌体标准液浓度作为横坐标制作标准曲线,如图3中C所示。标准曲线方程为: $y=0.03x+0.4077$, $R^2=0.983$,其中x为0-50 μ g/ μ L;

[0084] 4、外泌体样品浓度的测定

[0085] 取一定量待测外泌体样品,加入过0.22 μ m膜的PBS溶液补足到终体积为2mL。依次加入1 μ L步骤3中选定的A-3(200 μ M)和选定的B-4(2mM)混合母液,使染料A-3溶液的终浓度为100nM,使染料B-4溶液的终浓度为1 μ M。震荡均匀后室温下反应10min,测定染料A-3和染料B-4的荧光光谱。根据染料A-3和染料B-4的荧光光谱图,计算出染料B-4的荧光强度与染料A-3的荧光强度的比率值。

[0086] 根据染料A-3和染料B-4荧光强度的比率值以及样品稀释倍数参考标准曲线可以快速准确的得到待测外泌体样品的浓度。如果测试的结果不在标准曲线的线性范围内,则需要对样品进行适当稀释后,重复测定。

[0087] 实施例5来源于乳液中外泌体浓度测定

[0088] 1、来源于乳液中的外泌体制备

[0089] 参考文献报道的超速离心的方法进行乳液中外泌体的分离纯化。

[0090] 2、试剂盒染料A,B混合溶液配制

[0091] 配制染料A和染料B的混合DMSO母液,A为A-3,染料B为B-5。染料A的DMSO母液浓度为150 μ M,染料B的DMSO母液浓度为1.5mM。染料A和染料B最终使用浓度分别为150nM,1.5 μ M。

[0092] 3、荧光比率定量法标准曲线的制作

[0093] 分别取外泌体标准液0、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250 μ L,依次配成浓度为0、4.52、9.04、13.56、18.07、22.59、27.10、31.62、36.14、40.66、45.18 μ g/ μ L外泌体标准液。加过0.22 μ m膜的PBS溶液补足到终体积为2mL。分别加入1 μ L选定的染料A-3(150 μ M)和

选定的染料B-5 (1.5mM) 混合母液,使染料A-3溶液的终浓度为150nM,使染料B-5溶液的终浓度为1.5 μ M。震荡均匀后室温下反应10min,测定染料A-3和染料B-4的荧光光谱。以染料B-5荧光强度与染料A-3的荧光强度比率值作为纵坐标,外泌体标准液浓度作为横坐标制作标准曲线,如图3中D所示。标准曲线方程为: $y=0.027x+0.4999$, $R^2=0.996$,其中x为0-50ug/ μ L;

[0094] 4、外泌体样品浓度的测定

[0095] 取一定量待测外泌体样品,加入过0.22 μ M膜的PBS溶液补足到终体积为2mL。依次加入1 μ L步骤3中选定的A-3 (150 μ M) 和选定的B-5 (1.5mM) 混合母液,使染料A-3溶液的终浓度为150nM,使染料B-5溶液的终浓度为1.5 μ M。震荡均匀后室温下反应10min,测定染料A-3和染料B-5的荧光光谱。根据染料A-3和染料B-5的荧光光谱图,计算出染料B-5的荧光强度与染料A-3的荧光强度的比率值。

[0096] 根据染料A-3和染料B-5荧光强度的比率值以及样品稀释倍数参考标准曲线可以快速准确的得到待测外泌体样品的浓度。如果测试的结果不在标准曲线的线性范围内,则需要对样品进行适当稀释后,重复测定。

[0097] 综上所述,本发明提供一种外泌体快速定量的方法,基于两类荧光染料的比率定量,成功实现了生物样品中外泌体的测定。该方法具有效率高,成本低,操作方便等优点。有望在外泌体相关研究中得到广泛的应用。

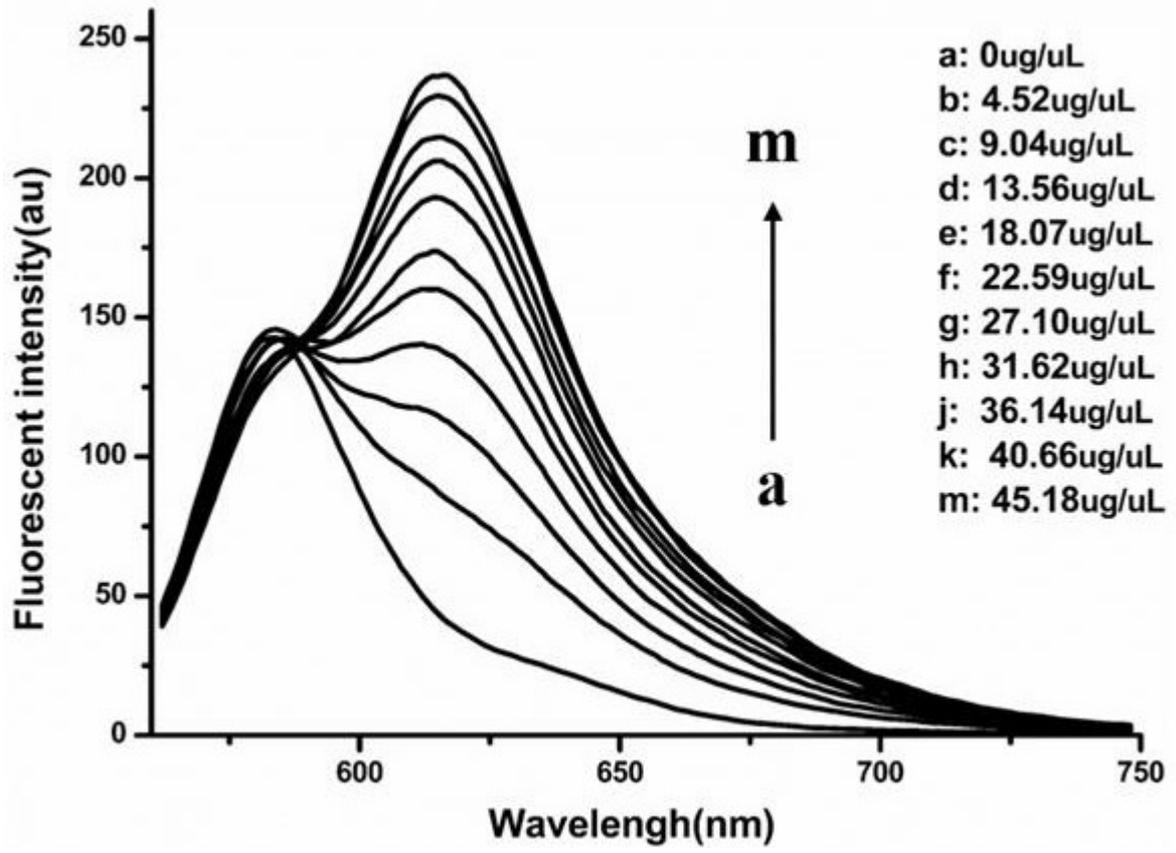


图1

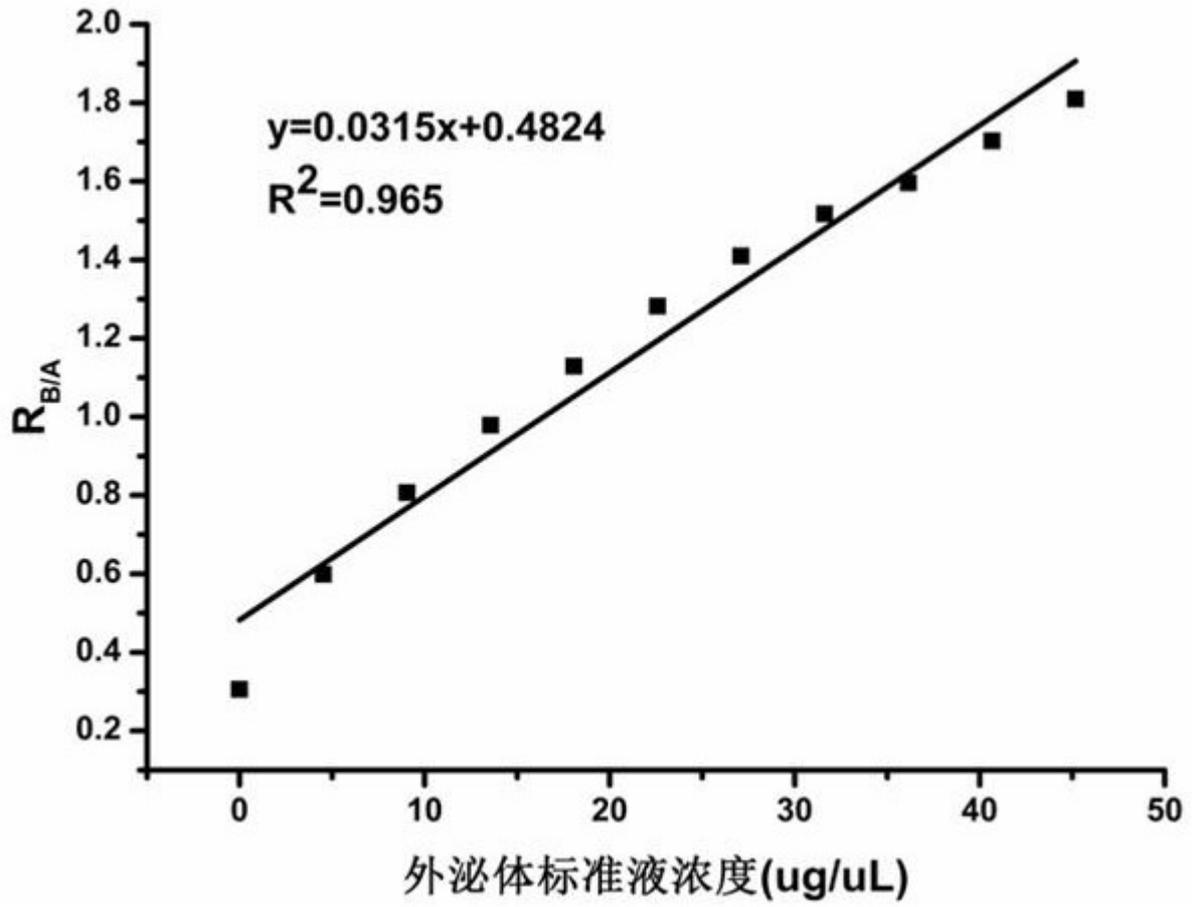


图2

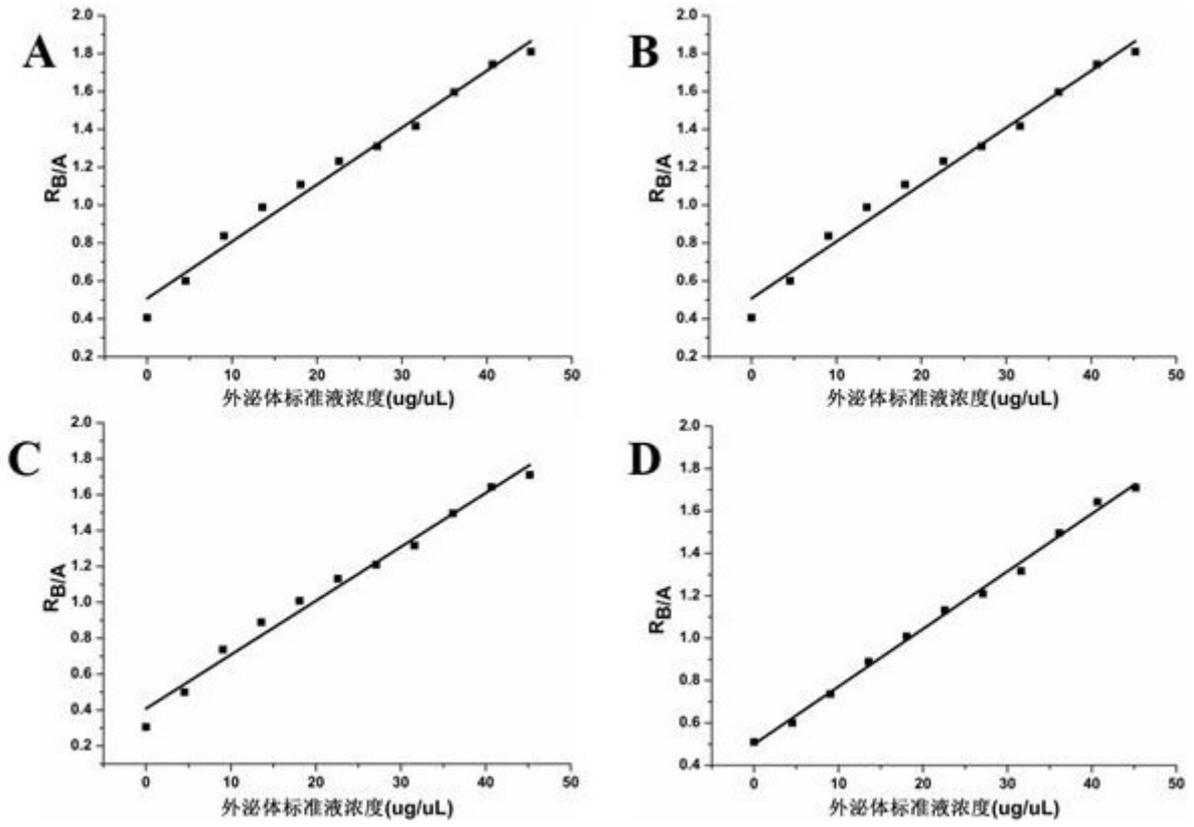


图3