



多莱泌生物科技（武汉）有限公司

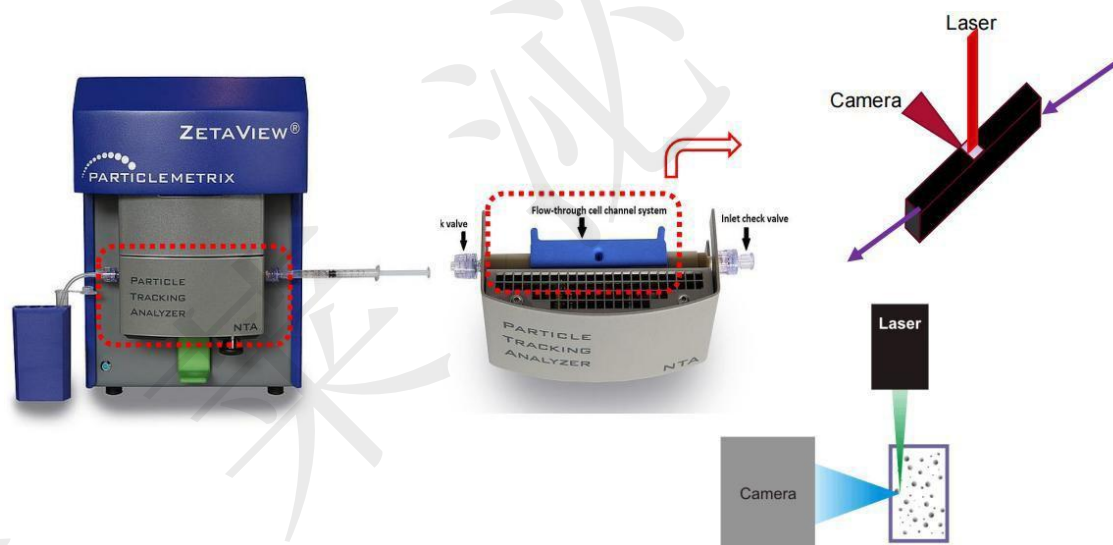
项目名称	纳米颗粒跟踪分析（NTA）		
检测样本	***（来源）外泌体		
客户姓名	001	实验室负责人	吴笛笛
报告撰写人	高小艳	报告复核人	刘丕菊
报告撰写日期	年-月-日		

纳米颗粒跟踪分析（NTA）报告

1. 实验原理

外泌体（Exosomes）是由细胞分泌产生的纳米级膜性囊性，粒径约为 30~150 nm。几乎所有类型细胞均可产生外泌体，因此动植物的组织间隙及体液（血液、唾液、尿液、母乳等）中均存在外泌体。外泌体携带有继承自母体细胞的多种生物信息分子，包括蛋白质、脂质、miRNA、lncRNA、circRNA、mRNA 等，通过介导细胞间通讯作用调控受体细胞的功能和表型，参与多种病理生理过程。

纳米颗粒跟踪分析技术（Nanoparticle Tracking Analysis, NTA）是国际细胞外囊泡协会推荐的用于外泌体表征的关键方法之一。其原理是基于光散射技术和单颗粒的布朗运动特性，分析悬浮液中目标样本的粒度分布和颗粒总数。NTA 可以在单颗粒水平对悬浮液中粒径分布范围较宽的样本进行逐一分析，最终输出外泌体样本的粒径和浓度信息，具有所需样本量少、分辨率高、检测速度快、准确度高等优点。



2. 实验目的

通过 NTA 检测外泌体样本的粒径分布和颗粒浓度。

3. 样本名称

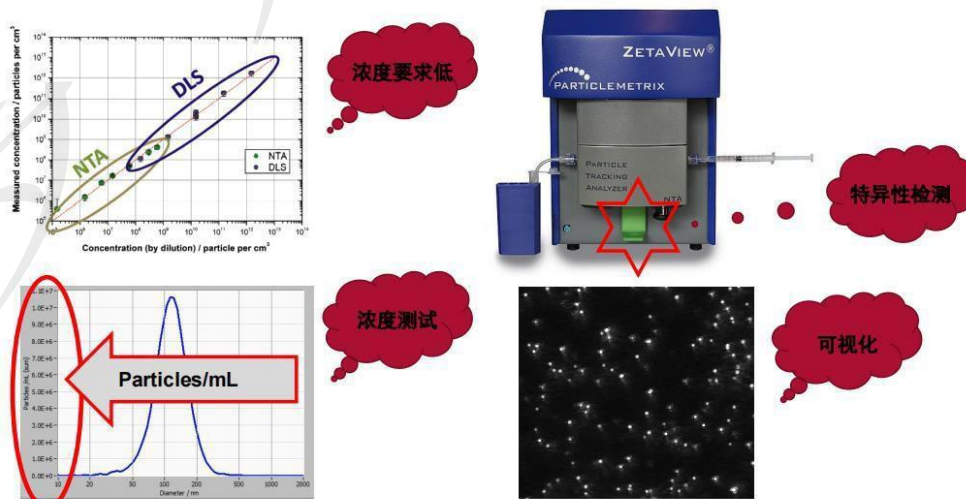
编号	名称	数量
***	*** (来源) 外泌体	1

4. 实验仪器、试剂

仪器名称	厂家	型号	产地
ZetaView_Particle Metrix	Particle Metrix	PMX-120	Germany
100nm PS beads	Thermo Fisher	3100A	USA
PBS	Servicebio	G4202-500ML	China

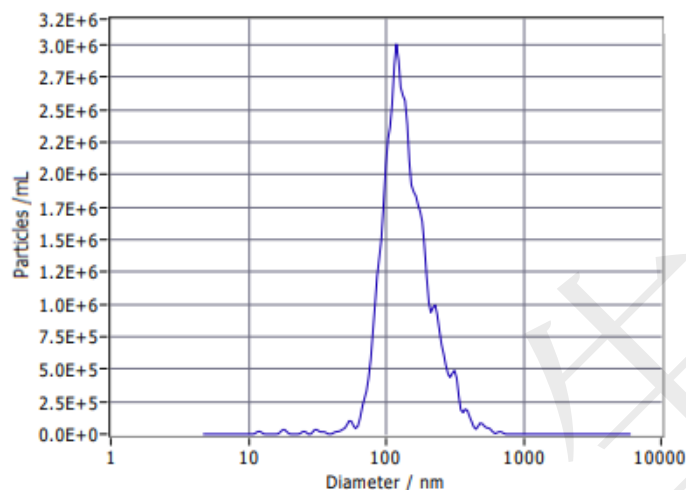
5. 操作步骤

- (1) 使用纯水清洗样本池 3 次；
- (2) 清洗干净后，使用标准品（100nm PS beads，聚苯乙烯微球）对仪器进行校准，校准完成后进行后续检测；
- (3) 使用 1×PBS 清洗样本池；
- (4) 样本用 1×PBS 稀释（稀释倍数见 PDF 报告中的 Dilution Factor）后加入到样本池中，通过计算机显示屏观察外泌体颗粒实时动态影像；
- (5) 采集信息，出相应检测报告；
- (6) 检测完后，使用 1×PBS 清洗进样池，进行下一个样本的检测。



6. 实验结果

***样本数据结果



Concentration

***E+7 Particles / mL

Dilution Factor

Original Concentration (文章需要数据)

***E+10 Particles / mL

Median (×50) (文章需要数据)

***nm

Peak Analysis (Concentration)

Diameter / nm	Particles/mL	FWHM / nm	Percentage
***nm	***E+6	***	***

结果分析：***样本上机检测浓度为***E+7Particles/mL，稀释倍数为1000，原始浓度为***E+10Particles/mL，Median (×50) 为***nm。

样本评价与建议：

评价：样本较好、较均一。

7. 附录

报告中的英文词汇	意义与解释
Concentration	检测浓度
Dilution Factor	稀释倍数
Original Concentration	原始浓度
×10	描述颗粒的直径，其中 10% 的分布具有较小的粒径。
×50	描述颗粒的直径，其中 50% 的分布具有较小的粒径。
×90	描述颗粒的直径，其中 90% 的分布具有较小的粒径。
Mean	中位数
StdDev	标准差

附件一：文献写作参考

Nanoparticle tracking analysis (NTA)

The number and size of YNVs were measured by nanoparticle tracking analysis (NTA) using a ZetaView_Particle Metrix (Particle Metrix, PMX-120, Germany). The instrument was calibrated with 100 nm polystyrene beads (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA) before use. NTA software was used to measure the concentration of nanoparticles (particles/mL). The batch process included in the NTA software was used to measurements of each sample.

JH Hwang et al. J Control Release. 2023 Mar;355:184-198. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.01.071

附件二：外泌体提取方法

1、血清外泌体提取

- (1) 血清通过 1500g 离心 10min，去除颗粒物；
- (2) 上清 4℃，10000g 离心 30min 去除小沉淀，吸取上清到新的离心管；
- (3) 0.22μm 滤器进行过滤，去除残渣；
- (4) 4℃，100000g 离心 1h；

- (5) 弃上清, 将下层白红色沉淀使用 PBS 重悬后 4℃, 100000g 离心 1h;
- (6) 弃上清, 底部外泌体沉淀加入 100-200μl PBS 重悬收集后保存于-80℃。

2、细胞上清/尿液外泌体提取

- (1) 细胞上清/尿液 4℃, 10000g 离心 30min 除杂, 吸取上清到新的离心管;
- (2) 样本量较大时需要浓缩, 浓缩方法为 100KD 超滤管 3500× g 离心 15min, 时间可根据样本调整;
- (3) 0.22 μm 滤膜过滤, 收集过滤液;
- (4) 将过滤液移至超离管中, 4℃, 120,000 × g 离心 90 min;
- (5) 去除上清, 用 100-200 μl (适当体积) 预冷的 1×PBS 重悬外泌体。

3、动物组织外泌体提取

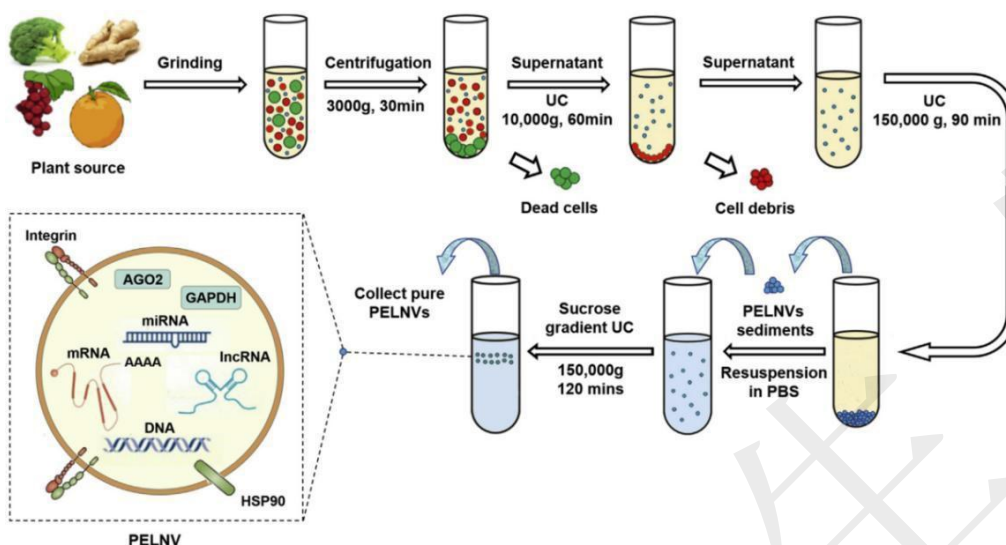
- (1) 用预冷的 1×PBS 洗涤组织, 并用无菌纱吸干组织表面水分;
- (2) 在 1.5ml EP 管中加入 2 滴 RPMI-1640, 用显微剪刀在 EP 管中将组织剪碎;
- (3) 将 EP 管内碎组织和溶液转移至 6 孔板中, 并加入 1.5 ml ~ 2 ml 消化液 (含胶原酶 IV 和 DNase I), 在 37℃振荡培养箱 (500 rpm) 中孵育 1 小时;
- (4) 70 μm 尼龙网或滤器过滤消化液;
- (5) 取液体 4℃, 300 g 离心 10min;
- (6) 取上清 4℃, 2000 g 离心 20min, 弃沉淀 (胶原酶 IV 颗粒、细胞碎片等);
- (7) 4℃, 10000 g 离心 45min, 弃沉淀 (进一步去除胶原酶 IV 颗粒和大细胞外囊泡);
- (8) 4℃, 120000 g 离心 70min, 100-200 μl (适当体积) 预冷的 1×PBS 重悬沉淀。

4、植物外泌体样纳米囊泡 (PELVs) 提取

- (1) 将植物清洗干净后研磨;
- (2) 4℃, 3000g 离心 30min 去除死细胞, 取上清;
- (3) 4℃, 10000g 离心 60min 去除细胞碎片, 取上清;
- (4) 4℃, 150000g 离心 90min, 弃上清;
- (5) 为了进一步纯化, 将匀浆悬浮液进行蔗糖梯度超离心 (SGC) (8%、15%、

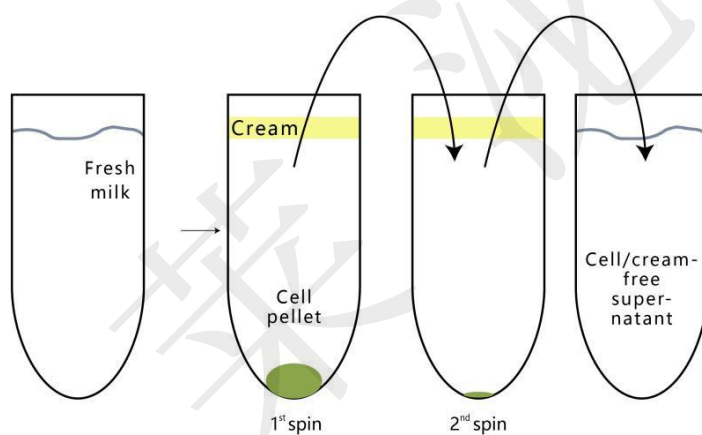
30%、45%和 60%），150000g 离心 120 分钟；

（6）30%/45%层的蔗糖梯度作为 PELNVs 的主要来源。



5、牛奶外泌体提取

（1）牛奶样本 4℃，5000g 离心 10min，取中间层乳清，上层脂肪和底部细胞都不要。示意图如下：



（2）乳清 4℃，16500g 离心 60min，得到澄清的上清液，底部掺杂不要，留上清；

（3）上清用 0.22μm 的滤器过滤，获取过滤后的牛奶澄清液；

（4）牛奶澄清液 4℃，100000g 超速离心 90min，弃上清；

（5）沉淀用 PBS 重悬后，4℃，100000g 离心 1h；

（6）去除上清，外泌体沉淀用适当体积预冷的 1×PBS 重悬。

附件三：外泌体相关技术服务

1 外泌体提取

提取：超速离心，试剂盒



图1. 不同外泌体来源的样本通过不同方法分离提取

2 外泌体鉴定

鉴定透射电镜 (TEM)

纳米示踪 (NTA)

Western Blot (WB)

纳米流式 (nFCM)

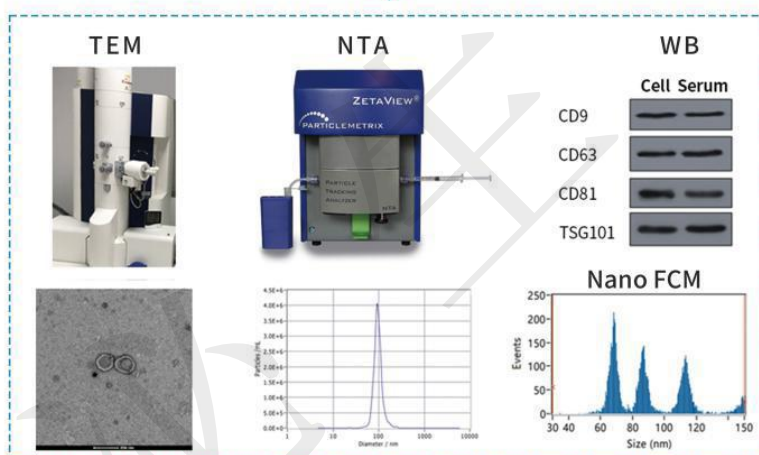


图2. 外泌体通过不同方式鉴定

3 外泌体示踪

示踪：通过激光共聚焦和活体成像分别对外泌体进入细胞和小鼠进行示踪。

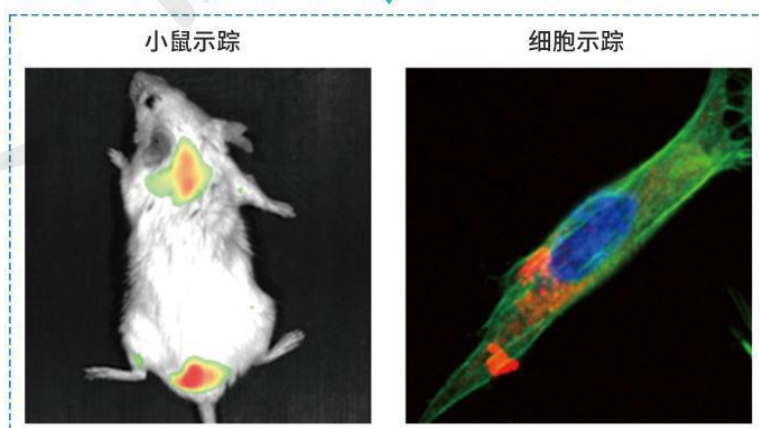


图3. 外泌体小鼠活体成像和细胞摄取外泌体示踪

4 外泌体组学

通过高通量测序及芯片、蛋白质组学、代谢组学对外泌体内溶物进行检测。

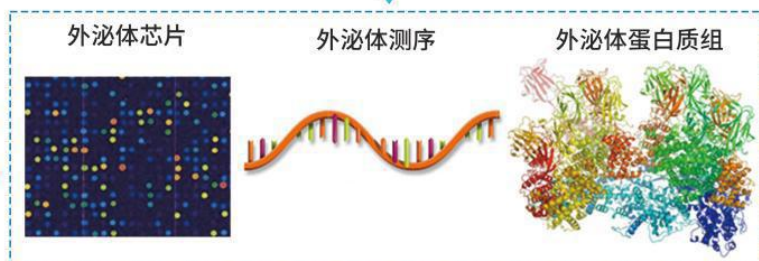


图4. 外泌体芯片 (mRNA、lncRNA、circRNA)，测序 (miRNA)，蛋白质组学