



## 多莱泌生物科技（武汉）有限公司

|        |                       |        |     |
|--------|-----------------------|--------|-----|
| 项目名称   | 透射电子显微镜检测分析（TEM）-负染样本 |        |     |
| 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                 |        |     |
| 产品批号   | *****                 |        |     |

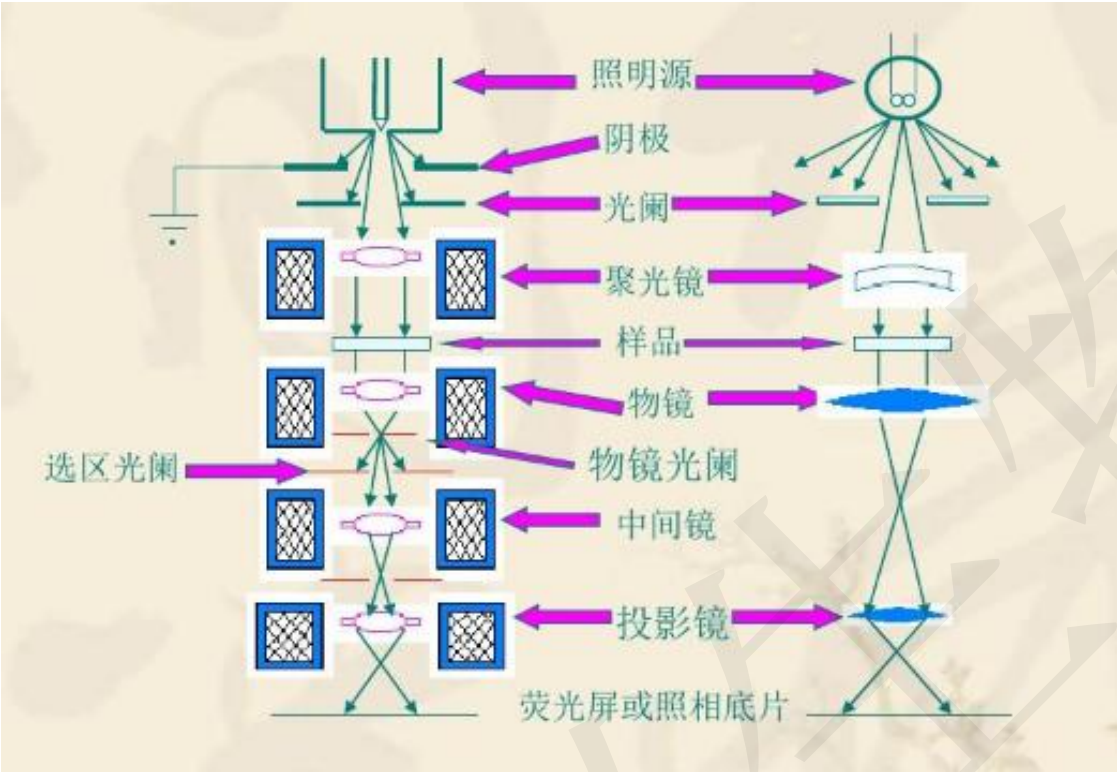
## 透射电子显微镜检测（TEM）报告

### 1. 实验原理

外泌体（Exosomes）是活细胞分泌的直径约为 30~150 nm 的膜性囊泡，密度为 1.13-1.19 g/ml，有典型的“杯盘”形态。外泌体几乎存在于所有的组织、细胞间隙、体液中，包括血液、唾液、尿液和母乳。外泌体携带了参与细胞内信号转导的蛋白、miRNA、lncRNA、circRNA、mRNA、DNA 以及其降解片段，参与细胞活动的重要调控。

透射电子显微镜（Transmission electron microscope, TEM）检测是外泌体表征检测手段之一。其原理是利用灯丝经加热后发射电子束，该电子束经栅极汇聚和阳极加速后作为透射电镜的照明源，再经过聚光镜的进一步汇聚照射在样品上，透过样品的电子束就带有样品的结构信息，经过物镜、第一中间镜、第二中间镜、投影镜的多级放大最后在荧光屏上呈现出样品超微结构的图像，具有分辨率高、被检测样本形态清晰可见等优点<sup>[1]</sup>。

染色原理：负染是一种染色方法，常用于不透光液体标本的镜检。由于其染色处理过程并非针对样本本身，故又称“衬托染色法”、“间接染色法”。在负染色法中，标本不需要热固定，样本不会因为化学药物的影响而变形，对于不易染色的细菌或病毒也能通过酸性染料来染色，如伊红或苯胺黑。负染是将样本背景染色，而使得没有被染色的样本很容易被观察到。



(工作原理示意图)

2. 实验目的

通过 TEM 检测外泌体样本的形态结构。

3. 实验试剂

| 编号    | 名称           | 货号        | 产地 |
|-------|--------------|-----------|----|
| 磷酸氢二钠 | 国药集团化学试剂有限公司 | 10020318  | 中国 |
| 磷酸二氢钠 | 国药集团化学试剂有限公司 | 200407190 | 中国 |
| 磷钨酸   | Solarbio     | G1870     | 中国 |

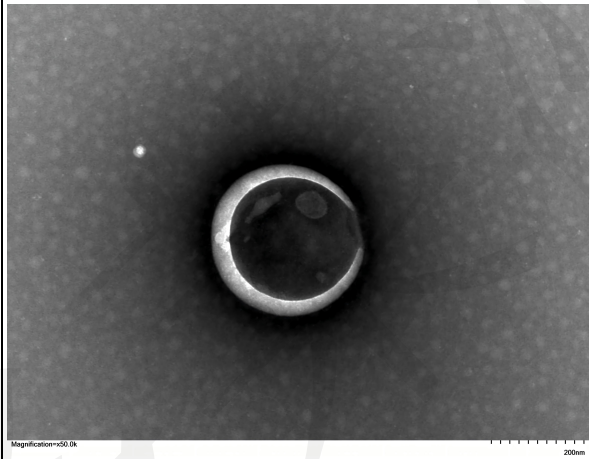
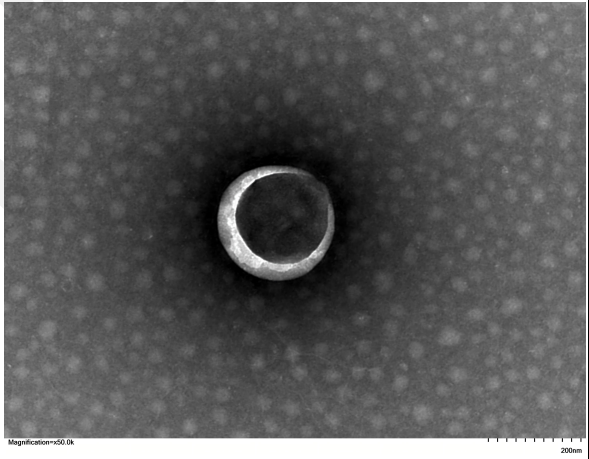
4. 实验仪器

| 仪器名称       | 厂家      | 型号     | 产地 |
|------------|---------|--------|----|
| 透射电子显微镜    | HITACHI | HT7700 | 日本 |
| 200 目方华膜铜网 | 中镜科仪    | AZH200 | 中国 |

5. 操作步骤<sup>[2, 3]</sup>

- （1）吸附：制备好的外泌体、病毒、细菌、细胞等悬液样本，用移液器吸取 10ul 悬液滴到事先准备好的封口膜上（封口膜背面粘附在桌子上），自然吸附 10-15 分钟，然后用滤纸条吸除多余的液滴，稍晾干；
- （2）染色：移液器吸取 2%磷钨酸溶液 10ul，滴于封口膜上，将吸附完成的铜网正面朝染色液，倒扣静置 3—5min；
- （3）干燥：滤纸条吸除多余的液滴，白炽灯下晾干；
- （4）观察拍照：透射电子显微镜下观察拍照；

6. 实验结果

| TEM 检测结果分析                                                                                                                    |                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                                                                                                             | 2                                                                                                                              |
|  <p>Magnification: x50.0k</p> <p>200nm</p> |  <p>Magnification: x50.0k</p> <p>200nm</p> |

结果分析：样本1. 2为\*\*\*外泌体样本TEM图，上述样本均能检测到茶托状的外泌体，且外泌体的形态结构清晰。

## 附件一：参考文献

1. Routine Collection of High-Resolution cryo-EM Datasets Using 200 KV Transmission Electron Microscope (DOI: 10.3791/63519)

2. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response (DOI: 10.1038/s41586-018-0392-8)

3. Sample Preparation for Transmission Electron Microscopy (DOI: 10.1007/978-1-4939-8935-5\_33)

## 附件二：英文写作参考（不要照抄，防止查重）

### Transmission electron microscopy (TEM)

1. For transmission electron microscopy (TEM) analysis, the isolated EVs (10ul) were placed on copper mesh for 5-10 min and absorbed the excess liquid by filter paper.
2. After being blotted and air-dried, the samples were stained with 2% uranyl acetate (10ul) and visualized by using the HT7700 transmission electron microscope (Hitachi, Japan).

## 附件三：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、细胞上清外泌体提取

- (1) 细胞上清 4℃，10000g 离心 30min 去除细胞碎片等沉淀，吸取细胞上清到新

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) 将过滤液移至新的离心管中，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、植物外泌体样纳米囊泡（PELNVs）提取

(1) 将植物清洗干净后研磨；

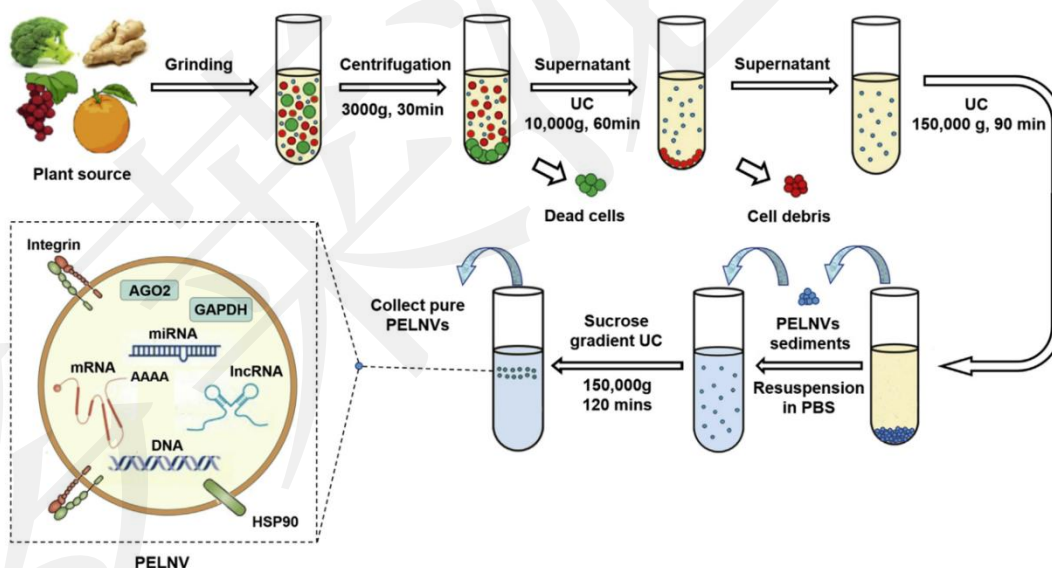
(2) 4℃，3000g 离心 30min 去除死细胞，取上清；

(3) 4℃，10000g 离心 60min 去除细胞碎片，取上清；

(4) 4℃，150000g 离心 90min，弃上清；

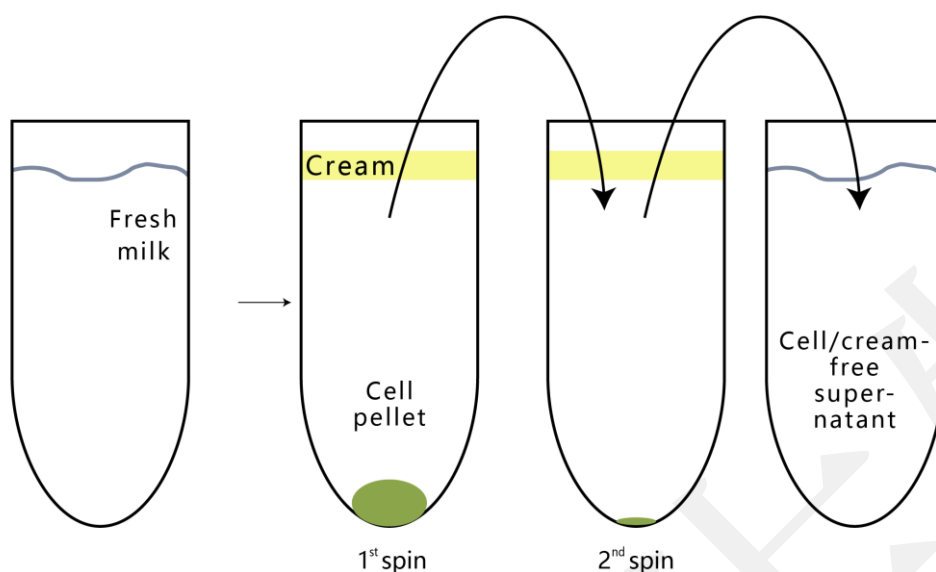
(5) 为了进一步纯化，将匀浆悬浮液进行蔗糖梯度超离心（SGC）（8%、15%、30%、45%和 60%），150000g 离心 120 分钟；

(6) 30%/45%层的蔗糖梯度作为 PELNVs 的主要来源。



### 4、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。