

· 综 述 ·

# 单个生物纳米颗粒分析技术与应用

丁翊捷, 李彩玉, 张师音, 葛胜祥\*

厦门大学公共卫生学院 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 传染病疫苗研发全国重点实验室,  
福建 厦门 361102

丁翊捷, 李彩玉, 张师音, 葛胜祥. 单个生物纳米颗粒分析技术与应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1352-1364.  
DING Yijie, LI Caiyu, ZHANG Shiyin, GE Shengxiang. Detection and analysis technologies for single biological nanoparticles[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1352-1364.

**摘 要:** 纳米检测技术在病毒、外泌体、小细菌和细胞器等生物医学研究中发挥着举足轻重的作用。目前已知最小的病毒颗粒直径仅为 17 nm, 近 20 年来研究火热的外泌体的粒径范围在 30–150 nm 之间。这些生物颗粒尺寸微小、生物性质复杂, 因此难以被富集和检测, 但却具有重要的研究价值。可以对单个纳米级颗粒检测和分析的技术正在被越来越广泛地应用到这一领域。一方面这些技术使得那些超过了光学检测下限的对象被灵敏、稳定地检测到; 另一方面, 这些技术也对这些微纳颗粒的各种其他性质提供了巧妙的分析手段。如今, 已经有若干基于纳米技术的商品化仪器先后问世, 这些系统提供了完整的单颗粒检测方案, 并根据各自的技术优势实现了独有的功能。但是这些技术在应用和检测能力上仍存在一定的局限性。本文从几个主流的商品化仪器的技术原理出发, 对其在应用中的优势、局限性以及未来的发展趋势进行了综述, 为研究人员选择和正确使用纳米检测技术提供了参考。

**关键词:** 生物纳米颗粒; 光学检测; 病毒; 细胞外囊泡; 标志物检测

## Detection and analysis technologies for single biological nanoparticles

DING Yijie, LI Caiyu, ZHANG Shiyin, GE Shengxiang\*

National Key Laboratory for the Research and Development of Infectious Disease Vaccines, National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

**Abstract:** In recent years, nanoscale detection has played an increasingly important role in the research on viruses, exosomes, small bacteria, and organelles. The small size and complex

资助项目: 福建省卫生健康委员会医学科研计划(2021ZD01006)

This work was supported by the Medical Research Program of the Health Commission of Fujian Province (2021ZD01006).

\*Corresponding author. E-mail: sxge@xmu.edu.cn

Received: 2023-12-20; Accepted: 2024-02-21; Published online: 2024-02-23

biological natures of these particles, with the smallest known virus particle measuring only 17 nm in diameter and exosomes ranging from 30 nm to 150 nm in size, pose challenges to the classical large-scale (typically micron-scale) characterization methods, which has become a major obstacle in the research. The emergence of nanoscale detection and analysis technologies has filled the gap of optical microscopy, a conventional technique in this field. These technologies enable the sensitive and robust detection of objects that exceed the lower limit of optical detection, revealing the molecular composition and biological roles simultaneously. Currently, several commercialized instruments based on nanotechnology have emerged, providing complete single-particle detection solutions and achieving unique functionality based on their respective technological advantages. However, it is inevitable that these technologies have limitations in terms of application and detection capabilities, as they continue to evolve. This paper offers a thorough overview of the principles, advantages, limitations, and future development trends of several mainstream commercial instruments, aiming to serve researchers in selecting and utilizing these technologies.

**Keywords:** biological nanoparticles; optical detection; viruses; extracellular vesicles; biomarker detection

近年来,单分子检测、单细胞分析技术不断发展<sup>[1-2]</sup>,精细流体控制、光学检测水平的提高,使得人们对于生物的微观世界有了更深入的了解。但仍有一些生物颗粒处在光学可检测范围的边缘,它们极难被一般的光学探测器探测到,例如细胞器<sup>[3]</sup>、小细菌<sup>[4]</sup>、细胞外囊泡<sup>[5]</sup>和病毒颗粒<sup>[6]</sup>等。最小病毒的直径仅 17 nm,临床上常见的病原体,如艾滋病毒、乙肝病毒、新冠病毒以及疱疹病毒等,它们的粒径一般分布在 50–200 nm 之间<sup>[7]</sup>;外泌体(exosomes, 30–150 nm)作为细胞外囊泡的主要成分之一,广泛存在于人体的血液、乳汁、尿液和唾液等多种体液中,与各种生理病理状态息息相关<sup>[8]</sup>。此外,还有细菌(最小的细菌直径约为 200–500 nm)<sup>[4]</sup>、线粒体(直径约为 0.5–1.0  $\mu\text{m}$ )<sup>[5]</sup>和纳米脂质体颗粒(40–200 nm)<sup>[9]</sup>等。对于纳米生物颗粒的研究,在癌症、线粒体病、病毒学和神经学等领域都有着极其重要的意义。可它们尺寸微小,且往往具有复杂的生物性质,普遍难以纯化和富集。因此,对这些生物纳米颗粒进行灵敏特异的检测并非易事。ELISA<sup>[10-11]</sup>、Western blotting<sup>[12]</sup>,

甚至以灵敏著称的 qPCR<sup>[13]</sup>等常规检测技术在外泌体等生物纳米颗粒领域都体现出检测性能方面的不足。针对单颗粒的生物纳米颗粒检测技术,首先是在灵敏度上具有绝对优势。传统检测模式需要大量、高纯度的样本才能得到可检测的信号值,纳米检测技术理论上可以仅对一个颗粒进行检测,这在许多临床研究中具有重要的价值<sup>[14]</sup>。

除此之外,针对单颗粒的检测技术需要对粒径这一重要参数进行测量。在外泌体、病毒等研究领域,颗粒的大小是一项十分重要的检验参数。国际囊泡协会对于外泌体的分类和定义就直接与粒径有关<sup>[5]</sup>;在药物递送领域,人工改造的外泌体、脂质体等纳米递送载体质量的好坏往往也需要以粒径作为质控参数<sup>[9]</sup>。单颗粒检测技术的出现,弥补了传统检测技术在粒径研究中的不足。

近年来,纳米检测技术在生物医学领域中的应用越来越广泛。高灵敏度的检测器与高分辨率的显微镜的进步与迭代<sup>[15-16]</sup>,催生出了多种可应用于生物纳米颗粒检测的技术,但是这些技术没

有完全成熟,均有各自的侧重点和局限性。已有研究表明,在完全不了解其技术原理的情况下,研究者们容易错误地使用这些技术,或者错误地解读分析结果<sup>[17]</sup>。若要正确选择并使用这些分析技术,就需要先对这些技术进行详细的了解。

本文从光学和非光学两条技术路线展开,介绍近年来最常用的单个生物纳米颗粒检测技术,它们如何巧妙地实现纳米级别的检测,以及这些技术在实际应用中的优缺点。值得注意的是,纳米检测技术的应用领域众多,本综述仅讨论这些单颗粒分析技术在生物领域中的应用情况。

## 1 光学检测技术

纳米颗粒在光学检测中的性质与宏观粒子有着显著的差异,这也是光学检测纳米颗粒的难点所在:首先,在产生散射的粒子粒径小于入射光波长的 1/10 时,宏观粒子所展现出的米氏散射<sup>[18]</sup>就会被瑞利散射<sup>[19]</sup>所替代;原先的米氏散射展现出方向差异性的散射光强,其在入射光方向上的散射强度最大,而瑞利散射为弹性散射,展现出各向同性的散射光强度。其次,根据 Rayleigh 散射理论(式 1):

$$\sigma_{scatt} = \frac{2\pi^5 d^6 n_{med}^4}{3\lambda^4} \left| \frac{m^2 - 1}{m^2 + 1} \right|^2 \quad (1)$$

式中,  $\sigma_{scatt}$  代表散射截面,  $d$  代表粒子直径,  $\lambda$  代表入射光的波长,  $n_{med}$  代表包围粒子的介质的折射率,而  $m$  是粒子的折射率( $n_{particle} = n_{rel} + in_{im}$ )与介质的折射率( $n_{med}$ )之比。基于计算得出的  $\sigma$  散射,检测粒径小于 100 nm 的单个粒子将非常具有挑战性,因为将检测限从 200 nm 降低到 100、40 和 25 nm 分别对应着信噪比大约 64、15 625 和 262 144 倍的增加。

上述计算说明,通过光学的直接观察是很难实现纳米级别的粒径测量的。一般而言通过光学的纳米粒径测量都是间接的测量技术。可直接测

量粒径的电子显微镜和原子力显微镜将在下一节进行详细介绍。

### 1.1 纳米流式细胞术

纳米流式细胞术(nano-flow cytometry, nFCM)是最早出现的光学纳米检测技术之一<sup>[15]</sup>。纳米流式配备了高能激发光光源,具有单光子计数能力的雪崩二极管,或者是高性能的光电倍增管<sup>[15]</sup>,只收集大角度或者垂直方向的侧向散射光(side-scattered light, SSC),并通过瑞利散射公式(式 1)中 SSC 信号和粒径大小的关系来反推颗粒的大小。改进后的光学系统非但能对小于 100 nm 的生物颗粒进行 SSC 检测,同时使得仪器具备了在流动相中检测单个荧光分子的能力<sup>[20]</sup>。

纳米流式的优点在于其优秀的检测性能:除了具备超高灵敏度,优秀的粒径测量准确性,还能同时收集多个荧光通道的信息<sup>[15,21]</sup>。基于纳米流式技术开发的检测系统 Flow NanoAnalyzer 可以对大于 40 nm 的生物颗粒进行粒径、浓度信息的检测,其粒径的检测精确度可达 5 nm 以下,并且配备 2 个荧光通道,可以进行简单的分群。虽然其基本检测模式与传统流式类似(图 1),但是该系统无需人工设门与补偿调节,具有双荧光通道,每个样品检测仅需 1 min<sup>[22]</sup>。

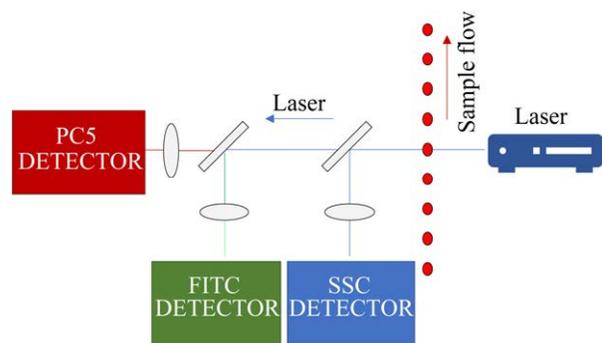


图 1 纳米流式的基本检测模式

Figure 1 Basic detection mode of nano-flow cytometry.

纳米流式也有一些局限性。首先基于散射光的检测并不具有选择性,近似尺寸的颗粒都会被记为阳性颗粒。因此,纳米流式对于样本纯度有较高的要求,不能直接检测血浆或培养上清中的纳米颗粒。另外,虽然纳米流式通过精细的液流控制让囊泡单个排列通过检测器,但是由于光学系统的限制,照射光斑的大小不能聚焦到单个囊泡级别的截面。当有2个以上的颗粒同时进入检测区,检测器只会把它们当作同一个单一事件来处理。因此纳米流式需要严格控制样本浓度,来降低颗粒重叠带来的影响<sup>[23]</sup>。此外,纳米流式借助荧光探针实现多靶标检测时,由于不便离心去掉未结合的探针,因此需要预先摸索荧光探针的最适用量,以尽量降低荧光背景带来的干扰。因此在实际使用中,对于样本颗粒浓度以及荧光染料浓度的最适条件摸索,将增加检测所需要的时间和操作难度。

## 1.2 动态光散射技术

动态光散射(dynamic light scattering, DLS)技术,又称光子相关光谱(photon correlation spectroscopy),是一种用于研究微粒子或分子在溶液中的尺寸、分布和运动特性的技术。它基于布朗运动的原理,通过在可检测相位内随机碰撞的微小粒子产生的干涉光进行颗粒大小和浓度的测量。首先,当粒子被高强度的光源照射后会发生散射,在特定角度下将接收器贴近粒子,在检测器上就会出现明暗交错的光斑。这些光斑是由于不同粒子的散射光彼此干涉产生的,而这些产生散射的粒子并不固定,而是在溶液环境中做布朗运动。首先,通过测量得出的散射光斑强度的衰减间隔值和散射粒子的扩散稀释满足(式2)的自适应方程:

$$G(\tau) = 1 + b \cdot e^{-2D_t q^2 \tau} \quad (2)$$

其中, $\tau$ 为衰减间隔, $G$ 代表它的场相关函数, $b$ 为与仪器和光学设置相关的常数, $D_t$ 为扩

散系数, $q$ 为散射矢量。然后根据爱因斯坦提出的扩散系数方程(式3):

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (3)$$

微小粒子在液体环境中的流体动力学半径,便可以通过散射光斑强度的衰减间隔的大小反推出来。在式(3)中, $D_t$ 是扩散系数; $k_B$ 是玻尔兹曼常数(约为 $1.380\ 649 \times 10^{-23}$  J/K); $T$ 是绝对温度,以开尔文(Kelvin)为单位; $\eta$ 是溶剂的动力黏度; $R_H$ 是颗粒的流体动力学半径。

DLS和nFCM都是非固定式的检测方式,也就是说所检测的颗粒是处于运动状态的。但是不同于nFCM需要将纳米颗粒进行液流聚焦,DLS技术的颗粒是处于随机扩散运动状态的,自由度更高。除了不需要精细的液流控制系统来产生单个排列的鞘液流以外,DLS还可以通过在液体环境中施加电场,检测在电场中粒子的定向运动情况,从而检测出粒子的质荷比。因此DLS相关的检测系统除了nFCM能提供的粒子粒径、浓度、生物分群信息外还可以提供粒子zeta电位的信息。

起初DLS技术引起了生物纳米颗粒检测行业的极大兴趣,基于DLS技术的技术方案包括英国Malvern公司的Zetasizer系列<sup>[24]</sup>、美国Wyatt公司的Mobius<sup>[25]</sup>等。但是在实际应用中,DLS也有很明显的局限性,使得这些公司和产品不得不整合更多其他技术以完善系统的性能。首先,DLS检测的散射光斑是颗粒之间干涉产生的,因此DLS一般要求样本的颗粒浓度较高,这样粒子间的干涉现象更容易发生,如果浓度过低,则粒子碰撞的概率下降,也会使得检测效果大打折扣。这样的特性一方面意味着对于样本浓度的限制,另一方面也意味着检测灵敏度的不足。其次,其公式中计算的流体动力学半径会相比于正常的颗粒半径更大,而且在相同粒径下,颗粒性状与表面亲疏水性也会显著影响流体动

力学半径,从而使得 DLS 的粒径测量数据失真<sup>[26]</sup>。基于 DLS 技术的局限性,纳米颗粒示踪技术应运而生。

### 1.3 纳米颗粒示踪

纳米颗粒示踪(nanoparticle tracking analysis, NTA)技术与 DLS 技术非常相似,前者实际上是后者在原理及技术上的改进。随着光学检测器的性能不断提升,更高数值孔径的检测器以及软件的发展,使得实时监测微小粒子散射光的运动轨迹成为可能。NTA 技术摒弃 DLS 通过捕捉散射光斑强弱变化对于粒子扩散性质的换算方式,直接实时动态分析整个界面内全部粒子的散射光,并记录每个粒子的运动轨迹。通过对二维方向内的运动轨迹的分析直接计算出粒子在液体环境中做布朗运动的扩散系数,再通过 stroke-Einstein (式 3)方程计算出粒子的流体动力学半径。

除此之外,更高性能的光学检测设备也赋予了 NTA 检测系统以高分辨荧光检测的能力,从而可以实现准确的分群或者表面标志物的检测<sup>[27]</sup>。NTA 与 DLS 一样可以实现 zeta 电位的测量,同时也继承了 DLS 技术在样本纯度要求上的一些局限性。但是由于 NTA 没有 DLS 技术对于样本高浓度的严格要求,原理上也可以实现单个颗粒的高敏检测,但是其实际仍需要一定的颗粒浓度,这是因为过高的灵敏度对于杂质也极其敏感。NTA 技术优秀的检测性能让其在应用方面的推广程度一度追赶 nFCM,成为主流的单个纳米颗粒检测技术之一。

基于 NTA 发展出的商品化检测系统有很多,包括 Malvern Instruments 的 NanoSight 系列以及 Particle Metrix<sup>[28]</sup>的 ZetaView 等。以 ZetaView 为例,其基本检测模式如图 2A 所示,可实现 0.01–2.00  $\mu\text{m}$  的可检测粒径范围,15 min/sample 的检测速度,在基础参数的检测中略微逊色于纳米流式。但是可选的六荧光通道以及可进行电导

率检测的能力让 NTA 独具一格<sup>[29]</sup>。

### 1.4 表面反射光干涉成像

表面反射光干涉成像(interferometric reflectance imaging sensing, IRIS)是近年来另一种被应用于生物领域的纳米检测技术。IRIS 技术最早于 2008 年由加州大学伯克利分校的研究人员提出<sup>[30]</sup>。通过光的干涉原理,对于可搭载样本的固相载体表面的折射率变化进行检测,从而得到样品浓度和性质,属于一种非标记的宏量检测。其原理如图 2B 所示:当光照射在一层薄的二氧化硅和硅表面上时,在两层固体表面分别会形成一次反射,由于恰当的二氧化硅层的厚度使得两束反射光可以发生干涉;当二氧化硅表面结合了一层生物分子或颗粒时(待检测靶标),由于生物分子和二氧化硅相似的光学折射性质,便会改变二氧化硅层的反射光相位,从而影响干涉现象。2015 年,波士顿大学的一个团队<sup>[31-32]</sup>通过使用薄氧化物来最小化不同角度下的光程差,在高数值孔径(numerical aperture, NA)下保持反射入射光的相对恒定的相位。使得单个纳米颗粒形成的干涉可被量化,最终实现单颗粒检测(single particle-interferometric reflectance imaging sensing, SP-IRIS)。由于不同大小的颗粒,在 IRIS 反射形成的相位差不同,所形成的干涉信号的强弱也不同。所以 IRIS 是通过干涉光斑强弱来推算粒径的。

作为一种固定式的单个纳米颗粒检测仪器,基于 SP-IRIS 技术原理下的商品化仪器 ExoView (NanoView Biosciences)也更符合生物检测中的思路,在检测之前一般先需要使用抗体或配体将待检测的纳米颗粒固定到固相表面,然后进行洗涤,并对固定的纳米颗粒进行单颗粒成像以及荧光检测。这样的检测模式相比于前面的流动式的检测模式,具有更高的检测特异性和更准确的样本亚群的区分能力。其次,本身仅有 50–200 nm

范围内的生物颗粒可以参与产生 IRIS 的反射光干涉,因此也一定程度上赋予了系统对于大的聚合物、灰尘颗粒等杂质的辨别能力。基于主动捕获的 SP-IRIS 可以兼容复杂样本类型,包括血浆、细胞上清等,无需进行超速离心即可上样检测。同时基于抗体捕获的策略,也可以实现在大量液体标本中富集极其微量生物颗粒的能力,进而实现超高灵敏度的检测。

但是相对地,基于抗体捕获的策略意味着只能捕获具有已知靶标的生物颗粒,而且单一的检测平面使得检测高浓度颗粒成为困难,由于捕获不完全或者洗涤带来的损失也使其很难进行极其准确的定量检测。因此该技术的劣势便是在操作时间、定量能力和粒径检测方面具有一定的局限性。

## 2 非光学检测技术

上文所述的光学检测系统,普遍在算法的基础上,通过散射光分辨单个“颗粒事件”以及针对每个颗粒的粒径进行计算。虽然这样的技术方案确实能够简单快捷地得到纳米颗粒的数值信息,但是显然也存在着不准确性,且无法对颗粒结构信息进一步解析的局限性。这些都是光学检测的极限导致的。光的波动特性决定了光学的最小分

辨率,一般认为当两个点分别落在彼此衍射最近的暗区,此时正好是可以分辨两点之间的极限距离,这个距离被称为阿贝极限。根据阿贝极限的表达式,两个点光源能够被光学系统分辨出来的最小距离(最小分辨距离)可以用以下公式表示(式 4):

$$d = 0.61 \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (4)$$

式中, $d$ 是两个点光源的最小分辨距离;0.61是一个经验系数; $\lambda$ 是光的波长; $NA$ 是数值孔径(numerical aperture),它描述了光学系统的收集和分辨能力,一般的光学显微镜的数值孔径最大为1。因此,光学系统的分辨极限大约就是光波长的一半,一般在200 nm左右。

光学检测首要目的是对目标颗粒的“有无”进行判别,可以理解为在如此微小的尺度下,出现阳性的光学信号仅代表这里有纳米颗粒,而这个信号来源的颗粒个数与形态往往无法鉴别。当需要对颗粒的结构、表面性质等做更进一步检测时,光学便不再能提供足够的信息,而非光学技术手段在这一领域最终得到了发展。一方面,一些基于电流检测、密度分流等非光学检测的思路,最终可以实现不亚于光学检测系统的定量检测性能。另一方面,基于电子束成像和微小力学

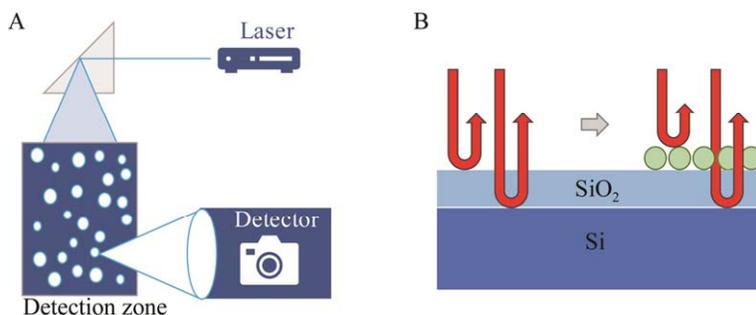


图 2 其他检测技术原理 A: NTA 的基本检测模式. B: IRIS 的检测原理

Figure 2 Other detection technology principles. A: Basic detection mode of NTA. B: Detection principle of IRIS.

测量的超高分辨率显微镜可以直接对纳米颗粒成像, 从而提供表面分子、颗粒形态等结构信息, 它们成为了研究生物纳米颗粒的另一类重要手段。

## 2.1 电子显微镜

电子显微镜(electron microscope, EM)使用电子束代替光束来观察微观结构, 相比于光学的分辨率极限, 电子束由于其更短的波长, 可以达到亚埃米级( $10^{-10}$  m)的分辨尺度。其对结构生物学领域的变革性影响引起了科学界的广泛关注。电镜成像的基本原理是用电子束来照射样品, 当电子束照射到样品上, 其中一部分电子将被样品中的原子核和电子云散射或吸收。这些散射或吸收事件会影响电子束的传播, 从而在电子接受器上产生可检测的信号。

EM 可分为扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)和透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)。TEM 适用于观察生物颗粒内部的细节结构, 如囊泡内容物分析等。而 SEM 适用于观察样品的形状、大小, 且无需像透射电镜一样要将样本制备成单层分布或超薄切片。

传统的透射电镜在成像中, 较低的电子剂量往往难以产生足够的信噪比, 较强的电子剂量又会严重损伤样品。因此在细节的呈现方面仍具有一定的局限性。冷冻电镜(cryo-electron microscope, Cryo-EM)通过将样品中的颗粒快速定型于玻璃态的冰中, 从而降低电子损伤带来的偏倚。同时, 冷冻固定使得粒子保持自然悬浮状态, 具有更真实的结构。因此, 冷冻电子显微镜为研究病毒<sup>[33]</sup>、细菌<sup>[34]</sup>的超微结构提供了绝佳的视野。

电子显微镜作为最常用的纳米成像技术, 被认为是最具指示能力的检测技术。在电镜图像中, 可以直接通过双层膜结构来区分外泌体(或

通过正 20 面体颗粒区分病毒颗粒), 相比于光学检测方法也更能对颗粒的完整性进行监测。电镜的缺点在于不能实现全面扫描, 因此无法给出粒径分布情况的信息, 并且无法定量, 以及很难鉴定亚群。但是电子显微镜仍在生物纳米颗粒分析中起到非常重要的作用<sup>[35]</sup>。国际细胞外囊泡协会(International Society for Extracellular Vesicles, ISEV)已经将电镜作为推荐的外泌体样本质量检测的主要方法之一。电镜在病毒检测和研究中也发挥着极其重要的作用, 在 20 世纪 60-90 年代, ELISA 和 PCR 等分子检测手段尚未发展起来时, 电子显微镜为许多类型病毒的发现都有着巨大的贡献。直到现在发现新的病毒类传染源时, 电镜仍能提供纳米级的细节信息和视野, 为人们尚不了解或难以检测的病毒提供有力的研究工具<sup>[36]</sup>。当然, 与现在愈发成熟的免疫、分子、电荷检测的多种技术相比, 电镜检测仍存在一些劣势, 比如需要复杂的样本处理, 背景噪声较严重以及制样中真空脱水的步骤可能导致生物颗粒的变性损伤等。整体而言, 电子显微镜技术在单个生物纳米颗粒分析中发挥着有限但不可替代的作用。

## 2.2 原子力显微镜

原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)是 20 世纪 80 年代出现的新型超高分辨显微镜, 其核心部件是一根纳米级别的力学探针。原子力显微镜的基本成像原理是通过纳米探针真实地接触样本表面, 二者之间的静电作用、范德华力、毛细力等相互作用力会让探针发生弹性弯折, 再通过激光臂来放大并记录这一弹性形变的信号, 通过探针的扫描移动, 进而得到检测对象的表面拓扑图像。一般情况下, 原子力显微镜的横向分辨率能达到 1.0 nm, 纵向分辨率为 0.2 nm。

除了在解析结构方面的功能, 原子力显微镜

测量原理的特殊性,使其在高分辨率成像的同时还具有高精度的微观力学测量能力。在细胞层面的各种生物行为中往往存在着许多极其微小的生物力学现象,原子力显微镜能够很好地补充生物领域在精细力学方面研究手段的空白。

原子力显微镜主要分为接触模式(contact mode)、非接触模式(non-contact mode)、共振模式(resonance mode)等,其中在生物领域中应用最多的 AFM 主要为接触模式和非接触模式。其中,接触模式很难用于软生物样品,因为样品中存在不必要的摩擦和可逆或不可逆的变形<sup>[37]</sup>,因此不常用于外泌体等纳米生物颗粒的成像。在生物纳米颗粒中应用的 AFM,主要是非接触式的(non-contact mode AFM),或者是轻敲式(tapping mode AFM)以及峰值力轻敲式(peak force tapping mode AFM)。

AFM 在评估不同分离方法对纯化生物纳米颗粒的影响方面有着显著的优势,因为它允许在单个颗粒和亚颗粒分辨率下直接可视化外泌体的大小和结构以及生物物理特性,如刚度、黏附性和变形<sup>[38]</sup>。原子力显微镜在囊泡表面结构的解析能力不输电子显微镜,得到纳米颗粒大小、形态、数量信息的同时,可以实现对于单个生物颗粒的黏附性、弹性、可变形性的检测。这是 AFM 独到的优势。

但是由于 AFM 的检测模式,所检测的生物颗粒必须良好地贴附在检测的载体表面上,并且往往需要足够的样本纯度。AFM 与电镜一样不能对于颗粒数量进行定量,并且由于颗粒并不是悬浮状态,AFM 得到的颗粒图像往往是扁平的,相比于电镜等方式其对于粒径的测量值可能存在一定的偏差。

### 2.3 可控电阻式脉冲感应

可控电阻式脉冲感应(tunable resistive pulse sensing, TRPS)是一种用于测量粒径在

0.04–11.00  $\mu\text{m}$  范围内的纳米颗粒的单粒子测量技术。TRPS 的技术原理属于 RPS 原理的改进和变种,其检测依托的基本结构是一种锥形可调弹性孔,当颗粒/分析物转移孔隙时,它们会暂时阻塞离子通道形成电流波动。由于生物颗粒的大小直接决定了其穿过膜孔时的阻挡电解质的截面积,TRPS 通过颗粒穿过膜孔时产生的电阻大小来确定颗粒的尺寸,以及波动的频率来确定颗粒浓度。与 DLS 以及 NTA 技术相似的是,TRPS 也可以计算颗粒的 zeta 电位。

应用 TRPS 原理开发的单颗粒检测仪器包括 Izon Science 的 qNano 系统、Spectradyne 的 nCS1 系统、qViro-X 的 qEV 系统等。为确保准确性和可重复性,这些系统往往会将每个测量的颗粒都与一组已知尺寸的 NIST 可追踪校准颗粒进行比较,NIST 可追踪校准颗粒是指由美国国家标准与技术研究院(National Institute of Standards and Technology, NIST)制备和认证的颗粒或微粒。因此,这些依据 TRPS 原理实现单颗粒检测的系统有着与 NTA、DLS 等技术接近的灵敏度、尺寸测量准确度,以及计数准确性<sup>[39]</sup>。在一些比较性研究中,TRPS 表现出相对更高的精确度,能够区分更小的尺寸和 zeta 的变化<sup>[40]</sup>。与 NTA 或是 nFCM 技术相似的是,TRPS 技术也同样需要高纯度的样本环境以及稳定且良好的颗粒分散性。且 TRPS 属于无标签检测,无法进行分群或其他生物方面的检测。这些因素限制了 TRPS 的应用。

## 3 总结与展望

### 3.1 单个生物纳米颗粒分析技术的转化应用

随着纳米检测技术的不断发展,研究人员对于生物微纳结构进行了更进一步的了解与掌控。除了本文详细介绍的技术以外,可以实现单个纳米颗粒检测的技术路线还有很多。例如单颗粒表

面等离子体共振(single particle-surface plasmon resonance, SP-SPR)<sup>[41]</sup>、单分子定位显微镜(single molecule localization microscopy, SMLM)<sup>[42]</sup>、全内反射荧光显微镜(total internal reflection fluorescence, TIRF)<sup>[43]</sup>、表面增强的拉曼散射光技术 (surface-enhanced Raman scattering, SERS)<sup>[44]</sup>等。这些技术都可以对病毒或外泌体等生物纳米颗粒实现有标记或无标记的单个颗粒检测。本综述难以穷举所有的技术,因此只对已经有商品化检测系统和方案的技术进行详细介绍。

以光学检测技术的代表——纳米流式为例,作为一种整合了单分子荧光检测与光散射检测的单颗粒分析技术,纳米流式更灵敏、准确地反映了生物靶标与生物纳米颗粒的定位关系。nanofcm 公司的研究团队利用其纳米流式仪器对于包括共孵育、电穿孔、挤压、冻融、超声和表面活性剂处理在内的 6 种常用的载药策略进行了评价,在单颗粒水平上测定不同递送策略下带荧光的 Dox 在囊泡中的包封率、EV 浓度、药物含量和膜蛋白<sup>[45]</sup>。此外,纳米流式还被用于表征 6 种不同的脂质纳米递送载体颗粒<sup>[46]</sup>、验证不同的膜染料在结合外泌体时的染色效果以及对于外泌体样本的不良影响<sup>[47]</sup>等。在体外诊断领域, Hu 等<sup>[48]</sup>利用纳米流式检测血浆中的细胞外囊泡来诊断鼻咽癌,得到优于 VCA-IgG 检测的结果,体现出纳米流式在检测纳米颗粒上痕量的蛋白的优势。

DLS、NTA 以及 IRIS 等其他光学检测技术在生物研究中的应用与纳米流式相似,NTA 可被用于测量纳米颗粒的浓度、粒径<sup>[49]</sup>,以及观察荧光染料与纳米颗粒的结合情况<sup>[50]</sup>。Sałaga-Zaleska 等<sup>[51]</sup>使用 NTA 测量尿液中的外泌体来检测肾功能或者肾损伤。Chong 等<sup>[52]</sup>利用 NTA 检测与蛋白共轭的金颗粒,从而对于蛋白-蛋白结合的分子动力学进行研究。Lin 等<sup>[53]</sup>使用

DLS 结合深度学习检测单细胞中线粒体动力学从而为三阴性乳腺癌分型,得到了 0.89 的分型准确率。Djukić 等<sup>[54]</sup>使用 DLS 检测循环免疫复合物的尺寸和 zeta 电位,确定了免疫复合物的胶体稳定性的下降、免疫复合物的尺寸与疾病之间的联系。Wang 等<sup>[55]</sup>使用 SP-IRIS 检测人支气管上皮细胞在 PM<sub>2.5</sub> 暴露的环境下分泌的外泌体,揭示了空气污染造成心肺功能障碍的部分原因。Karimi 等<sup>[56]</sup>基于 SP-IRIS 在不同抗凝剂处理的血浆中评价了 4 次跨膜蛋白的分布情况,验证出在不同抗凝剂类型的血浆中,血小板分泌外泌体的占比有显著的区别,可能最终影响血浆外泌体的检测与研究。可见,这些新兴的单颗粒检测技术在实际应用中均体现出可靠的检测性能,具有特殊的实用功能与价值。

### 3.2 单个生物纳米颗粒分析技术的性能特点

笔者所在的团队长期开展基于血液中细胞外囊泡的诊断研究工作,在工作中对于外泌体纯化效果进行监测时,需要借助纳米流式、NTA 或者 SP-IRIS 等技术对外泌体数量、粒径进行评价,以及使用电镜等单颗粒成像技术观察囊泡的外观与完整性。在我们的研究中,囊泡的数量、粒径、完整性以及囊泡上的 4 次跨膜蛋白均是我们关注的信息。基于团队实际的使用经验,与一些比较性文章中提出的观点<sup>[14,57]</sup>,本文整理了几种最为常用的纳米颗粒检测技术在实际应用中的性能与特点。具体分析见表 1。

首先在测量粒径方面,可以直接成像的电镜是金标准方法。在其他技术中,纳米流式的粒径检测更符合电镜结果,而 NTA 与 DLS 的测量值偏大,这可能是由于后两者换算的是流体动力学半径,但是整体仍呈现可靠的线性关系<sup>[17]</sup>。其次,颗粒数量也是非常重要的信息,纳米流式等光学检测技术通过流式或全面扫描的策略对样本中的全部粒子进行计数,在这一点上,光学检

测技术优于电镜等成像技术。但是值得注意的是, 纳米流式中的液流速度是 nL 级别的, 因此仅能对极小体积中的颗粒进行检测; NTA 技术通过选取 11 个截面来代替立方空间内的全部粒子情况。它们理论上都属于非全局的统计。因此, 这些检测技术对于样本纯度、粒子的分散性和稳定性有着一定的要求。另外, 在目前对于生物标记物的检测方案中, 最优解仍是基于荧光抗体或荧光核酸探针的生物标记策略, 同样需要依赖高分辨率荧光检测系统。因此, 基于光学的纳米颗粒检测技术仍是目前最具发展前景的。一方面基于光学的检测手段可以整合荧光系统实现多靶标检测, 另一方面光学系统可以整合全面扫描或流式检测的策略实现定量检测。这些特点使得光学检测技术弥补电镜检测的不足, 占据了相当大的市场份额, 并仍在蓬勃发展。

另外, 检测数据的非特异性也是值得注意的问题。在上述技术中, 绝大多数都只能对于纯化后的纳米颗粒进行检测。首先, 纯化这些纳米颗

粒是一项困难的工作, 其次在许多真实标本中, 例如血浆, 在如此复杂的蛋白环境中, 通过超速离心分离的纳米颗粒样本中难以去除蛋白聚体、脂质体颗粒等杂质。这些杂质颗粒具有和外泌体、病毒相近的颗粒尺寸, 因此能够产生相似的散射光信号产生假阳性。如果可以直接在复杂的水浆环境中检测外泌体, 势必会增加可用性。目前能实现这一功能的仅有 NanoView 的 ExoView 系统, 它通过抗体捕获目标外泌体, 洗涤去除非特异性黏附的杂质颗粒, 再对结合后的囊泡干燥处理并进行检测。虽然 ExoView 基于抗体的富集策略会在计数上带来一定的偏差, 但是未来, 为了解决非特异性的问题, 生物纳米分析领域可能会整合固相载体免疫捕获的方案, 例如借助 Simoa 单分子检测、xMAPs 悬浮芯片等技术方案, 先实现特异性捕获和洗涤, 将目标颗粒进行固定和纯化, 再进行单颗粒分析。

其次, 有些技术仍存在着通量低、时间长、成本高等缺点。这些问题进一步限制了单颗粒检

表 1 各种单个纳米颗粒检测技术的性能与应用情况

Table 1 Performance and application of various single nanoparticle detection technologies

Technical names	Size range	Sensitivity	Sample requirements	Detection duration	Labeling capability	Operability	Representative products	Literatures or websites
nFCM	≥40 nm	+++	High	<30 min	+++	++	Nanofcm@Flow NanoAnalyzer	[22]
DLS	1–50 μm	+	High	<30 min	+	++	Malvern@Zetasizer Nano	[24]
NTA	0.01–20.00 μm	+++	High	<20 min	+++	+++	Particle Metrix@ZetaView	[28]
SP-IRIS	50–200 nm	+++	Low	>1 d	+++	++	NanoView@ExoView	[31]
TRPS	40 nm–11 μm	++	High	>1.5 h	–	++	Izon@Exoid	[39]
EM	>0.1 nm	+	High	>4 h	+/-	+	–	[36]
AFM	>1 nm	+	High	>2 h	–	+	–	[38]

Most technologies themselves do not inherently have the capability to detect biomarkers. The assessment of biomarker detection capability in the table is based on the analysis of their representative products, indicating the compatibility of these technologies with fluorescent labeling systems. In this table, “+++” stands for excellent performance, “++” stands for good performance, “+” stands for moderate performance, and “–” indicates lack of corresponding performance or inapplicability.

测技术在科研应用中的推广以及在临床上的应用。多通道和多靶标的检测也是该领域未来发展的方向之一,这也更符合一般生物样本检测的需求。无论是通过核酸杂交、抗体结合或是染料直接结合,在纳米尺度上检测荧光信号,意味着需要整合高敏的荧光检测系统,结合抗体进行生物靶标分析的检测也同时意味着对于生物颗粒完整性的保证。

总之,越来越多的研究正在向着外泌体、病毒等纳米级别的生物单位上集中,在未来数年单个纳米颗粒检测技术在生物医学领域的应用将会进一步扩大。该领域也将向着特异、高通量、多靶标的方向继续发展。

## REFERENCES

- [1] GENCO E, MODENA F, SARCINA L, BJÖRKSTRÖM K, BRUNETTI C, CAIRONI M, CAPUTO M, DEMARTIS VM, Di FRANCO C, FRUSCONI G, HAEBERLE L, LARIZZA P, MANCINI MT, ÖSTERBACKA R, REEVES W, SCAMARCIO G, SCANDURRA C, WHEELER M, CANTATORE E, ESPOSITO I, et al. A single-molecule bioelectronic portable array for early diagnosis of pancreatic cancer precursors[J]. *Advanced Materials*, 2023, 35(42): e2304102.
- [2] YOUN W, KIM JY, PARK J, KIM N, CHOI H, CHO H, CHOI IS. Single-cell nanoencapsulation: from passive to active shells[J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(35): e1907001.
- [3] HAMPL V, ČEPIČKA I, ELIÁŠ M. Was the mitochondrion necessary to start eukaryogenesis?[J]. *Trends in Microbiology*, 2019, 27(2): 96-104.
- [4] VOLOKHOV DV, GRAHAM LJ, BRORSON KA, CHIZHIKOV VE. *Mycoplasma* testing of cell substrates and biologics: review of alternative non-microbiological techniques[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2011, 25(2/3): 69-77.
- [5] KALLURI R, LeBLEU VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [6] DeLONG JP, AL-SAMMAK MA, AL-AMEELI ZT, DUNIGAN DD, EDWARDS KF, FUHRMANN JJ, GLEGHORN JP, LI HQ, HARAMOTO K, HARRISON AO, MARSTON MF, MOORE RM, POLSON SW, FERRELL BD, SALSBERY ME, SCHVARCZ CR, SHIRAZI J, STEWARD GF, van ETEN JL, WOMMACK KE. Towards an integrative view of virus phenotypes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20: 83-94.
- [7] ZWART MP, ELENA SF. Matters of size: genetic bottlenecks in virus infection and their potential impact on evolution[J]. *Annual Review of Virology*, 2015, 2(1): 161-179.
- [8] IGNATIADIS M, SLEDGE GW, JEFFREY SS. Liquid biopsy enters the clinic-implementation issues and future challenges[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2021, 18: 297-312.
- [9] TORCHILIN VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, 4: 145-160.
- [10] AGLIARDI C, MELONI M, GUERINI FR, ZANZOTTERA M, BOLOGNESI E, BAGLIO F, CLERICI M. Oligomeric  $\alpha$ -Syn and SNARE complex proteins in peripheral extracellular vesicles of neural origin are biomarkers for Parkinson's disease[J]. *Neurobiology of Disease*, 2021, 148: 105185.
- [11] DORSEY ER, SHERER T, OKUN MS, BLOEM BR. The emerging evidence of the parkinson pandemic[J]. *Journal of Parkinson's Disease*, 2018, 8(s1): S3-S8.
- [12] CERRI S, GHEZZI C, SAMPIERI M, SIANI F, AVENALI M, DORNINI G, ZANGAGLIA R, MINAFRA B, BLANDINI F. The exosomal/total  $\alpha$ -synuclein ratio in plasma is associated with glucocerebrosidase activity and correlates with measures of disease severity in PD patients[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2018, 12: 125.
- [13] BARBAGALLO C, MOSTILE G, BAGLIERI G, GIUNTA F, LUCA A, RACITI L, ZAPPIA M, PURRELLO M, RAGUSA M, NICOLETTI A. Specific signatures of serum miRNAs as potential biomarkers to discriminate clinically similar neurodegenerative and vascular-related diseases[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2020, 40(4): 531-546.
- [14] ZHANG J, WU JC, WANG GZ, HE LX, ZHENG ZW, WU MH, ZHANG YQ. Extracellular vesicles: techniques and biomedical applications related to single vesicle analysis[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(18): 17668-17698.
- [15] ROBINSON JP. Flow cytometry: past and future[J]. *BioTechniques*, 2022, 72(4): 159-169.
- [16] LIAN H, HE SB, CHEN CX, YAN XM. Flow cytometric analysis of nanoscale biological particles and organelles[J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2019, 12(1): 389-409.

- [17] FILIPPOV SK, KHUSNUTDINOV R, MURMILIUK A, INAM W, ZAKHAROVA LY, ZHANG HB, KHUTORYANSKIY VV. Dynamic light scattering and transmission electron microscopy in drug delivery: a roadmap for correct characterization of nanoparticles and interpretation of results[J]. *Materials Horizons*, 2023, 10(12): 5354-5370.
- [18] ROSS DJ, SIGEL R. Mie scattering by soft core-shell particles and its applications to ellipsometric light scattering[J]. *Physical Review*, 2012, E 85:056710.
- [19] FAN XF, ZHENG WT, SINGH DJ. Light scattering and surface plasmons on small spherical particles[J]. *Light: Science & Applications*, 2014, 3(6): e179.
- [20] NGUYEN DC, KELLER RA, JETT JH, MARTIN JC. Detection of single molecules of phycoerythrin in hydrodynamically focused flows by laser-induced fluorescence[J]. *Analytical Chemistry*, 1987, 59(17): 2158-2161.
- [21] PAROLO C, SENA-TORRALBA A, BERGUA JF, CALUCHO E, FUENTES-CHUST C, HU LM, RIVAS L, ÁLVAREZ-DIDUK R, NGUYEN EP, CINTI S, QUESADA-GONZÁLEZ D, MERKOÇI A. Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays[J]. *Nature Protocols*, 2020, 15: 3788-3816.
- [22] Nanofcm admin August 24, 2021 <https://www.nanofcm.cn/>
- [23] GAUDIN R, BARTENEVA NS. Sorting of small infectious virus particles by flow virometry reveals distinct infectivity profiles[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6022.
- [24] Malvern Panalytical Ltd., <https://www.malvernpanalytical.com/en/>
- [25] Wyatt technology, <https://www.wyatt.com/zh-hans/>
- [26] BHATTACHARJEE S. DLS and zeta potential-what they are and what they are not?[J]. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 2016, 235: 337-351.
- [27] SHARMA V, NIKOLAJEFF F, KUMAR S. Employing nanoparticle tracking analysis of salivary neuronal exosomes for early detection of neurodegenerative diseases[J]. *Translational Neurodegeneration*, 2023, 12(1): 7.
- [28] Particle-metrix, <https://particle-metrix.com/>
- [29] BACHURSKI D, SCHULDNER M, NGUYEN PH, MALZ A, REINERS KS, GRENZI PC, BABATZ F, SCHAUSS AC, HANSEN HP, HALLEK M, von STRANDMANN EP. Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis-an accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2019, 8(1): 1596016.
- [30] OZKUMUR E, NEEDHAM JW, BERGSTEIN DA, GONZALEZ R, CABODI M, GERSHONI JM, GOLDBERG BB, UNLÜ, MS. Label-free and dynamic detection of biomolecular interactions for high-throughput microarray applications[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105: 7988-7992.
- [31] SEYMOUR E, KANIK FE, GÜR SD, BAKHSHPOUR-YUCEL M, ARAZ A, ÜNLÜ NL, ÜNLÜ MS. Solid-phase optical sensing techniques for sensitive virus detection[J]. *Sensors*, 2023, 23(11): 5018.
- [32] AVCI O, ÜNLÜ NL, ÖZKUMUR AY, ÜNLÜ MS. Interferometric reflectance imaging sensor (IRIS): a platform technology for multiplexed diagnostics and digital detection[J]. *Sensors*, 2015, 15(7): 17649-17665.
- [33] MEYER NL, CHAPMAN MS. Adeno-associated virus (AAV) cell entry: structural insights[J]. *Trends in Microbiology*, 2022, 30(5): 432-451.
- [34] WANG FB, GNEWOU O, SOLEMANIFAR A, CONTICELLO VP, EGELMAN EH. Cryo-EM of helical polymers[J]. *Chemical Reviews*, 2022, 122(17): 14055-14065.
- [35] EARL LA, FALCONIERI V, MILNE JL, SUBRAMANIAM S. Cryo-EM: beyond the microscope[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2017, 46: 71-78.
- [36] WU MY, LANDER GC. Present and emerging methodologies in cryo-EM single-particle analysis[J]. *Biophysical Journal*, 2020, 119(7): 1281-1289.
- [37] DUFRÊNE YF, ANDO T, GARCIA R, ALSTEENS D, MARTINEZ-MARTIN D, ENGEL A, GERBER C, MÜLLER DJ. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology[J]. *Nature Nanotechnology*, 2017, 12(4): 295-307.
- [38] WOO J, SHARMA S, GIMZEWSKI J. The role of isolation methods on a nanoscale surface structure and its effect on the size of exosomes[J]. *Journal of Circulating Biomarkers*, 2016, 5: 11.
- [39] VARENNE F, MAKKY A, GAUCHER-DELMAS M, VIOLLEAU F, VAUTHIER C. Multimodal dispersion of nanoparticles: a comprehensive evaluation of size distribution with 9 size measurement methods[J]. *Pharmaceutical Research*, 2016, 33(5): 1220-1234.
- [40] Izon Science Limited 2023, <https://www.izon.com/trps/overview>.
- [41] YANG Y, SHEN G, WANG H, LI H, ZHANG T, TAO N, DING X, YU H. Interferometric plasmonic imaging and detection of single exosomes[J]. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(41): 10275-10280.
- [42] CHEN C, ZONG S, WANG Z, LU, J, ZHU D, ZHANG Y, ZHANG R, CUI Y. Visualization and intracellular dynamic tracking of exosomes and exosomal miRNAs using single molecule localization microscopy[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(11): 5154-5162.
- [43] HE DG, HO SL, CHAN HN, WANG HZ, HAI L, HE XX, WANG KM, LI HW. Molecular-recognition-based DNA nanodevices for enhancing the direct visualization and quantification of single vesicles of tumor exosomes in plasma microsomes[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(4): 2768-2775.
- [44] FRAIRE JC, STREMER S, BOUCKAERT D, MONTEYNE T, de BEER T, WUYTENS P, de RYCKE R, SKIRTACH AG, RAEMDONCK K, de SMEDT S, BRAECKMANS K. Improved label-free identification of individual exosome-like vesicles with Au@Ag nanoparticles as SERS substrate[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(43): 39424-39435.
- [45] CHEN C, LI YR, WANG QQ, CAI NG, WU LN, YAN XM. Single-particle assessment of six different drug-loading strategies for incorporating doxorubicin into small extracellular vesicles[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2023, 415(7): 1287-1298.
- [46] RIEHLE R, PATTNI B, JHAVERI A, KULKARNI A, THAKUR G, DEGTEREV A, TORCHILIN V. Combination nanopreparations of a novel proapoptotic drug-NCL-240, TRAIL and siRNA[J]. *Pharmaceutical Research*, 2016, 33(7): 1587-1601.
- [47] CHEN C, CAI N, NIU Q, TIAN Y, HU Y, YAN X. Quantitative assessment of lipophilic membrane dye-based labelling of extracellular vesicles by nano-flow cytometry[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2023, 12(8): e12351.
- [48] HU YY, TIAN Y, DI HN, XUE CF, ZHENG YP, HU B, LIN Q, YAN XM. Noninvasive diagnosis of nasopharyngeal carcinoma based on phenotypic profiling of viral and tumor markers on plasma extracellular vesicles[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(27): 9740-9749.
- [49] SILMORE KS, GONG X, STRANO MS, SWAN JW. High-resolution nanoparticle sizing with maximum a posteriori nanoparticle tracking analysis[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(4): 3940-3952.
- [50] CARNELL-MORRIS P, TANNETTA D, SIUPA A, HOLE P, DRAGOVIC R. Analysis of extracellular vesicles using fluorescence nanoparticle tracking analysis[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1660: 153-173.
- [51] SAŁAGA-ZALESKA K, KUČHTA A, BZOMA B, CHYŁA-DANIŁ G, SAFIANOWSKA A, PŁOSKA A, KALINOWSKI L, DĘBSKA-ŚLIZIEŃ A, JANKOWSKI M. Nanoparticle tracking analysis of urinary extracellular vesicle proteins as a new challenge in laboratory medicine[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(15): 12228.
- [52] CHONG WL, CHUPRADIT K, CHIN SP, KHOO MM, KHOR SM, TAYAPIWATANA C, NIMMANPIPIG P, THONGKUM W, LEE VS. Protein-protein interactions: insight from molecular dynamics simulations and nanoparticle tracking analysis[J]. *Molecules*, 2021, 26(18): 5696.
- [53] LIN MA, LIU T, ZHENG YX, MA XY. Dynamic light scattering microscopy sensing mitochondria dynamics for label-free detection of triple-negative breast cancer enhanced by deep learning[J]. *Biomedical Optics Express*, 2023, 14(10): 5048.
- [54] DJUKIĆ T, DRVENICA I, KOVAČIĆ M, MINIĆ R, VUČETIĆ D, MAJERIĆ D, ŠEFIK-BUKILICA M, SAVIĆ O, BUGARSKI B, ILIĆ V. Dynamic light scattering analysis of immune complexes in sera of rheumatoid arthritis patients[J]. *Analytical Biochemistry*, 2023, 674: 115194.
- [55] WANG HY, WANG TH, RUI W, XIE JX, XIE YL, ZHANG X, GUAN LF, LI GP, LEI ZY, SCHIFFELERS RM, SLUIJTER JPG, XIAO JJ. Extracellular vesicles enclosed-miR-421 suppresses air pollution (PM<sub>2.5</sub>)-induced cardiac dysfunction via ACE2 signalling[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2022, 11(5): e12222.
- [56] KARIMI N, DALIRFARDOUEI R, DIAS T, LÖTVALL J, LÄSSER C. Tetraspanins distinguish separate extracellular vesicle subpopulations in human serum and plasma-contributions of platelet extracellular vesicles in plasma samples[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2022, 11(5): e12213.
- [57] ARAB T, MALLICK ER, HUANG YY, DONG L, LIAO ZH, ZHAO ZZ, GOLOLOBOVA O, SMITH B, HAUGHEY NJ, PIANTA KJ, SLUSHER BS, TARWATER PM, TOSAR JP, ZIVKOVIC AM, VREELAND WN, PAULAITIS ME, WITWER KW. Characterization of extracellular vesicles and synthetic nanoparticles with four orthogonal single-particle analysis platforms[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2021, 10(6): e12079.

(本文责编 陈宏宇)