

# 细胞外囊泡的单颗粒分析技术

胡芸芸, 底浩楠, 赖辉燕, 李雨柔, 陈晨, 田野, 颜晓梅\*

(厦门大学 化学化工学院 化学生物学系, 谱学分析与仪器教育部重点实验室,  
化学生物学福建省重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 细胞外囊泡(Extracellular vesicles, EVs)是细胞分泌到细胞外基质中的纳米尺度的脂质小膜泡, 携带着母细胞来源的各种生物活性分子, 如蛋白质、核酸、脂质等, 是细胞间沟通交流的信使。EVs参与免疫调控、血管新生、疾病发生、肿瘤转移等生理病理过程, 广泛存在于各种体液中, 在液体活检、疾病治疗中显示出巨大的应用前景, 也因此成为生命科学领域炙手可热的前沿研究方向。然而EVs在粒径、生化组成等方面具有高度的个体差异性和多样性。因此, 迫切需要发展EVs的单颗粒分析技术以精准表征EVs亚群的分子组成, 深入了解其生物学功能, 促进EVs临床诊断与治疗应用的发展。该文针对近年来发展的EVs的单颗粒分析技术进行综述, 从检测原理、性能和应用范围等方面对这些技术进行讨论, 并对单颗粒表征技术未来的发展趋势进行了展望。

**关键词:** 细胞外囊泡; 单颗粒分析技术; 荧光显微成像技术; 流式细胞术; 纳米流式检测技术

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2022)09-1345-10

## Advances on Single Particle Analysis for Extracellular Vesicles

HU Yun-yun, DI Hao-nan, LAI Hui-yan, LI Yu-rou, CHEN Chen, TIAN Ye, YAN Xiao-mei\*

(Department of Chemical Biology, MOE Key Laboratory of Spectrochemical Analysis & Instrumentation,  
Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry and  
Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Extracellular vesicles (EVs) are nanoscale membrane-bound vesicles secreted by almost all the cell types to mediate intracellular communication via transferring bioactive molecules including proteins, nucleic acids and lipids. EVs have stimulated considerable scientific and clinical interest owing to their active participations in multiple pathophysiological processes and potential utility as diagnostic markers and therapeutic entities. However, EVs are extremely heterogeneous not only in particle size but also in the molecular compositions. Therefore, there is a desperate need to develop advanced techniques facilitating quantitative multiparameter analysis of single EV to identify different EV subtypes, unraveling their biological functions, and promoting the development of EV-based clinical applications. In this review, the emerging techniques for single EV analysis (SVA) in recent years are summarized. The technological advances in the characterization and phenotyping of EVs are described. Moreover, new insights into the challenges and the future development of SVA are given.

**Key words:** extracellular vesicles (EVs); single particle analysis; fluorescence microscopy; flow cytometry; nano-flow cytometry

细胞外囊泡(Extracellular vesicles, EVs)是自然界中各种细胞均能分泌的具有磷脂双层膜结构的纳米尺度膜泡, 普遍存在于各种体液中。根据分泌途径的不同, EVs主要分为多泡体与细胞膜融合释放的外泌体(Exosomes, Exos, 40 ~ 160 nm)及细胞膜直接出芽脱落的微囊泡(Microvesicles, MVs, 50 ~ 1 000 nm)<sup>[1]</sup>。EVs携带有丰富的活性生物分子如蛋白质、核酸、脂质等, 是细胞间沟通交流的信使, 在临床诊疗中显示出广阔的应用前景<sup>[1-2]</sup>。EVs不仅个体极其微小, 携带的生物分子含量极低, 而且因细胞来源、细胞状态以及分泌途径等不同, 使得EVs在粒径、分子组成及生物学功能上具有高度的个

收稿日期: 2022-05-31; 修回日期: 2022-07-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(21934004, 21627811); 国家基础科学人才培养基金项目(J1310024)

\* 通讯作者: 颜晓梅, 博士, 教授, 研究方向: 纳米流式检测技术的研发及其在生命科学、生物医药、食品安全、环境监测、能源材料领域中的应用, E-mail: xmyan@xmu.edu.cn

体差异性和多样性。然而,传统的生化检测方法如蛋白质印迹法(Western blotting)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、聚合酶链式反应(PCR)等均是对众多的EVs进行集权平均分析,掩盖了EVs的个体差异,无法分辨EVs的亚群信息。因此,在单颗粒水平对EVs进行精准分析成为亟待解决的科学难题。为此,研究者们相继开发出一系列可对EVs的形貌、粒径等生物物理性质以及蛋白、核酸、脂质等生物化学性质进行表征的单颗粒分析(Single vesicle analysis, SVA)技术,为EVs的分泌、运输和调控机制的研究以及疾病诊断和治疗方法的开发提供了重要的技术支撑<sup>[3-4]</sup>。本文针对EVs的SVA技术进行综述,分析并讨论了电子和原子力显微成像技术、纳米颗粒跟踪分析技术(Nanoparticle tracking analysis, NTA)、可调式电阻脉冲传感技术(Tunable resistive pulse sensing, TRPS)、拉曼光谱技术(Raman spectroscopy, RS)、表面等离子体共振技术(Surface plasmon resonance, SPR)、干涉相关显微成像技术(Interference microscopy, IM)、单分子荧光显微成像技术(Single molecular fluorescence microscopy, SMFM)、数字化方法(Digital methods, DM)和流式细胞术(Flow cytometry, FCM)等的性能及应用进展,并对SVA技术的未来发展趋势进行了展望。

## 1 EVs形貌、粒径、颗粒浓度的表征技术

### 1.1 电子及原子力显微成像技术

所谓“眼见为实”,显微成像技术被广泛应用于EVs形貌、粒径等生物物理性质的表征。其中,透射电子显微镜(Transmission electron microscopy, TEM)<sup>[5]</sup>和扫描电子显微镜(Scanning electron microscopy, SEM)<sup>[6]</sup>是对EVs形貌和粒径进行表征的经典方法,但这些技术在样本制备过程中必须经过固定、脱水等步骤,无法反映EVs的天然形貌特征。冷冻透射电镜(Cryogenic transmission electron microscopy, Cryo-TEM)是将样本中的溶剂进行快速冷冻固定后,在低温环境下使用TEM对生物样本进行分析的技术,规避了干燥、脱水等步骤,可以保证EVs膜结构的完整性<sup>[7]</sup>。而原子力显微镜(Atomic force microscopy, AFM)<sup>[8]</sup>基于探针与样品之间的力学反馈信号,不仅可以获得单个EVs的形貌、粒径信息,也可获得其粘度、硬度等物理信息。然而昂贵的仪器设备、严苛的技术要求限制了Cryo-TEM和AFM在单个EVs表征中的应用。此外,这些显微成像技术均存在所需样本浓度高、样品制作复杂、分析速度慢、粒径分布缺乏统计代表性等优点,难以实现对EVs粒径、颗粒浓度及生化组成的快速表征。

### 1.2 纳米颗粒跟踪分析技术、可调式电阻脉冲传感技术

NTA是一种可对EVs粒径分布和颗粒浓度进行快速、实时、可视化分析的单颗粒表征技术<sup>[9-10]</sup>。该技术采用激光照射基底上的EVs悬浮液,通过高速相机对视野中颗粒的散射光点进行拍照,进而追踪分析每个颗粒的布朗运动轨迹以获得扩散系数,再根据Stokes-Einstein方程计算EVs的水合粒径。与此同时,根据视野中的颗粒数量可以计算出颗粒的浓度。除此之外,NTA技术还可通过引入膜染料、免疫荧光抗体等荧光标记策略,在荧光模式下对携带特定蛋白<sup>[11-12]</sup>、核酸<sup>[13]</sup>的EVs浓度进行定量分析。例如,Baldwin等<sup>[13]</sup>利用脂质体将Cy3标记的分子信标运载入EVs,实现了对单个EVs内miR-21的实时检测,并计算出miR-21的平均拷贝数为44。近期,Kashkanova等<sup>[14]</sup>发展的iNTA(Interferometric NTA)技术将NTA与激光干涉散射成像技术(Interferometric scattering microscopy, iSCAT)联用,使Au纳米颗粒的散射检测限推进至10 nm,且可对多分散性样品中的不同组分进行精准检测与区分。研究人员通过颗粒的粒径和干涉信号值可直接计算出单个纳米颗粒的折射率。但由于NTA是将纳米颗粒在三维空间的布朗运动投射到一个二维的平面,扩散路径小于真实值,导致测定的粒径结果偏大;此外所测得的颗粒粒径包括颗粒的水化层,这些因素导致NTA的粒径测定值往往比真实值偏大,粒径分布相比于真实分布更宽。随着其他新型SVA技术的发展,NTA技术逐渐局限于EVs粒径分布和颗粒浓度的表征分析<sup>[3]</sup>。

TRPS是一种利用纳米孔技术对溶液中纳米颗粒的粒径分布和浓度在单颗粒水平进行快速测定的技术<sup>[15-16]</sup>。当EVs通过聚氨酯膜纳米孔时,孔隙阻力增加,纳米孔两端的电流发生瞬时下降,其下降幅度与EVs的粒径呈现相关关系,据此可推导出单个EVs的粒径。然而,由于EVs的粒径分布广,粒径较大的EVs往往导致纳米孔的堵塞并阻碍进一步测量。

2016年,Akers等<sup>[17]</sup>分别采用NTA和TRPS技术对脑脊液来源的EVs浓度、粒径进行测定,并对比

其表征结果。该研究指出, 相比于TRPS, NTA在小于150 nm的粒径范围内能检测到更多的EVs颗粒; 而针对粒径大于150 nm的EVs, 检测结果正好相反。近期, Bachurski等<sup>[9]</sup>对比了NanoSight NS300和ZetaView两款不同生产厂家的NTA仪器在EVs粒径分布和浓度表征方面的优劣。其中, NanoSight NS300使用更高倍数的物镜对EVs进行示踪分析, 测得的颗粒粒径分布具有更高的分辨率; 而ZetaView可以对样品池内11个不同平面的颗粒进行侦测, 能够获得更准确的EVs浓度信息。

## 2 EVs蛋白、核酸、脂质等生物分子的表征技术

### 2.1 拉曼光谱技术

激光光镊拉曼光谱技术(Laser tweezers Raman spectroscopy, LTRS)在拉曼散射光谱的基础上引入激光光镊技术, 可实现单个EVs的光学捕获并对其蛋白、核酸、脂质等生物分子进行无标记的定性或定量表征<sup>[18-20]</sup>。2015年, Smith等<sup>[19]</sup>使用LTRS对肺癌细胞上清来源的EVs进行表征, 发现EVs的异质性主要源于磷脂和胆固醇的相对含量及总蛋白含量的差异, 并根据磷脂和胆固醇的相对含量成功区分出正常细胞和癌细胞的EVs。但是, LTRS技术存在检测通量低、灵敏度不足等缺点。为此, Penders等<sup>[21]</sup>开发了单颗粒拉曼光谱自动化分析平台(Single particle automated Raman trapping analysis, SPARTA)(图1), 显著提升了检测通量, 并成功区分了11种乳腺癌细胞系的EVs, 其灵敏度与特异度均高于95%<sup>[22]</sup>。而Stremersch等<sup>[23]</sup>则将表面增强拉曼光谱(Surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)应用于EVs的检测, 通过静电吸附作用将金纳米颗粒包覆在EVs表面来增强单个EVs的拉曼散射信号, 可将混合样品中黑色素瘤来源的EVs与红细胞分泌的EVs区分开来。但拉曼散射光谱技术存在所需EVs用量高的缺点, 限制了其在临床上的应用。

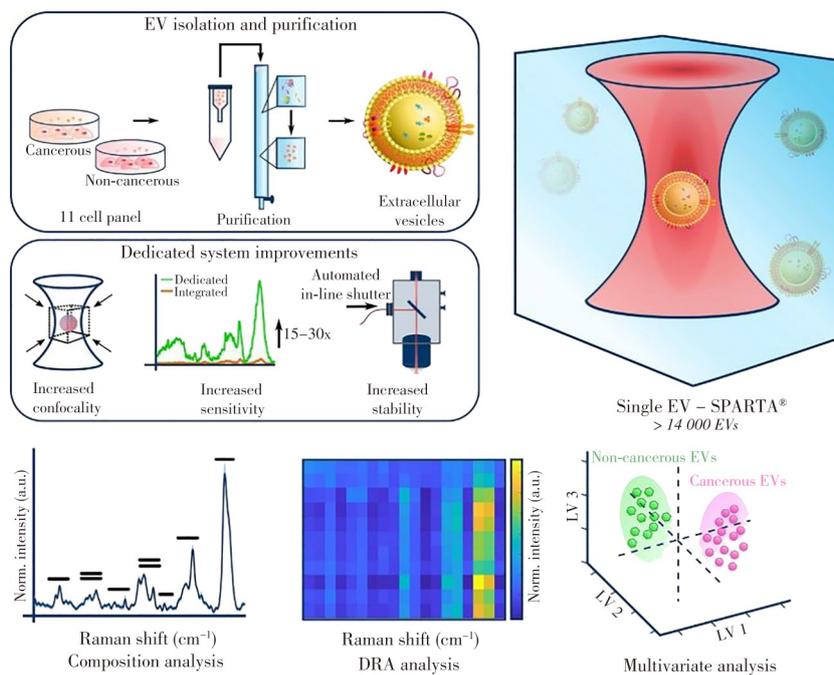


图1 单颗粒拉曼光谱自动化分析平台(SPARTA)原理图<sup>[21]</sup>

Fig. 1 The scheme of SPARTA<sup>[21]</sup>

### 2.2 表面等离子体共振技术

SPR技术可对生物分子间的相互作用进行无标记实时检测, 近年来逐渐应用于EVs蛋白<sup>[24-28]</sup>、核酸<sup>[29]</sup>等的分析表征中。2017年, Liang等<sup>[25]</sup>开发的纳米等离子体增强散射平台(Nanoplasmon-enhanced scattering, nPES)在单颗粒水平实现了对血浆EVs的蛋白表征。研究人员分别使用金纳米棒和金纳米球修饰的CD63和EphA2抗体标记EVs, 当EVs同时存在这两种蛋白时, 金纳米颗粒的相互靠近会造成散射光谱的位移及强度变化, 由此实现了对单个EVs表面CD63和EphA2蛋白分子的定量检测。该平台只需使用1  $\mu$ L的血浆样本便可实现健康人、胰腺癌病人与胰腺炎病人的良好区分, 大大拓展了SPR技术在临床诊断上的应用。

## 2.3 干涉相关显微成像技术

干涉相关显微成像技术是基于光的干涉原理对纳米颗粒进行成像的技术,包括基于激光的干涉散射显微成像技术(Interferometric scattering microscopy, iSCAT)<sup>[14]</sup>和干涉反射成像技术(Interferometric reflectance imaging sensing, IRIS)。其中, iSCAT通过采集激光光源与纳米颗粒瑞利散射光的干涉信号进行成像,需要精良的光学元件和严苛的实验条件。而IRIS则是基于基底与纳米颗粒来源的两束反射光的干涉信号实现纳米颗粒的实时成像,易于实施,更常应用于生物领域的研究中。

Daaboul等发展的单颗粒干涉反射成像传感技术(Single particle interferometric reflectance imaging sensing, SP-IRIS)已成功应用于单个病毒<sup>[30]</sup>、EVs<sup>[31]</sup>等纳米颗粒的粒径和浓度表征分析(图2A)。2018年,美国NanoView Biosciences推出了全自动化外泌体荧光检测分析系统——ExoView,其利用荧光模式的SP-IRIS平台实现对单个EVs上多种蛋白的荧光共定位分析(图2B)<sup>[32-38]</sup>。Jiang等<sup>[36]</sup>对细菌进行工程化改造,在细菌外膜囊泡(Outer membrane vesicles, OMVs)表面修饰上D001、D003或MM43三种新冠病毒S蛋白,利用ExoView对OMVs进行蛋白表征和浓度定量分析,为新冠疫苗的开发与研制提供了全新的研究思路。近期,Gebara等<sup>[37]</sup>将ExoView和超分辨荧光显微镜技术联用,对羊水来源EVs的分析结果表明CD105<sup>+</sup> EVs可作为先兆子痫疾病的标志物。尽管如此,Arab等<sup>[35]</sup>通过对比ExoView、NTA、TRPS和纳米流式检测技术(Nanoflow cytometry, NFCM)4种单颗粒表征技术在EVs浓度、粒径和蛋白含量方面的表征能力,指出SP-IRIS并无法对EVs浓度进行准确的定量分析。

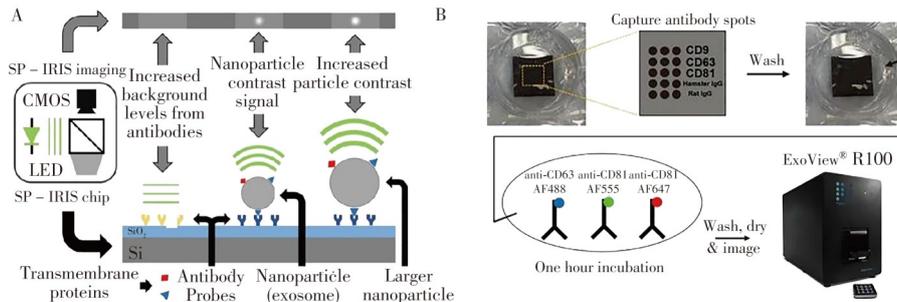


图2 单颗粒干涉反射成像传感技术(SP-IRIS)原理图<sup>[31]</sup>(A); ExoView平台对单个EVs上CD63、CD81和CD9蛋白的分析流程图<sup>[38]</sup>(B)

Fig. 2 The scheme of SP-IRIS system<sup>[31]</sup>(A); the scheme of ExoView platform for single-EV phenotyping<sup>[38]</sup>(B)

## 2.4 单分子荧光显微成像技术

**2.4.1 全内反射荧光显微技术** 荧光显微成像技术是探索EVs分泌途径、转运过程和摄取机制最常用的研究工具之一,该技术常与微流控芯片联用以实现EVs的高通量检测<sup>[39-41]</sup>。其中,全内反射荧光显微技术(Total internal reflection fluorescence microscopy, TIRF)是最常应用于EVs蛋白<sup>[27,42-43]</sup>和核酸<sup>[27,44]</sup>表征的单分子荧光成像技术。在蛋白表征方面,东南大学崔一平教授团队<sup>[43]</sup>联合TIRF平台和DNA点积累纳米级拓扑成像技术(DNA points accumulation for imaging in nanoscale topography, DNA-PAINT)实现了对单个EVs上HER2、GPC-1、EpCAM和EGFR的同时检测(图3A)。在该技术中,成像链和对接链瞬时杂交和解离过程伴随着荧光“闪烁”现象。鉴于方程 $\text{Number of proteins} = (k_{\text{on}} \times c_i \times \tau_d)^{-1}$ 中解离常数 $k_{\text{on}}$ 与成像链的浓度 $c_i$ 为固定值,因此单个EVs上蛋白的数量与TIRF成像仪记录下的荧光寿命的倒数 $\tau_d^{-1}$ 呈现正相关,据此可计算出单个EVs特定蛋白的拷贝数。结合机器学习算法,研究人员进一步将该技术应用于胰腺癌和乳腺癌样本的分型检测,其准确度高达100%。在核酸表征方面,He等<sup>[44]</sup>利用TIRF实现了单个EVs中miR-21的原位表征。如图3B所示,其检测原理为:miR-21分子信标上的DNAzyme序列(D1、D2)在 $\text{Mg}^{2+}$ 激活下发挥酶切割功能,将分子信标切割并释放出荧光基团,从而被TIRF检测。此研究揭示癌症病人血清EVs的miR-21水平可用于肿瘤检测和治疗预后分析。最近,Zhou等<sup>[45]</sup>开发的高通量纳米生物芯片集成系统液体活检技术(High-throughput nano-bio chip integrated system for liquid biopsy, HNCIB)则在TIRF成像平台上实现了EVs表面蛋白和内部mRNA/miRNA的同时表征。在临床样本分析中,通过对血浆EVs的PD-L1、PD-L1 mRNA和miR-21进行检测,实现了肺癌患者与健康人的良好区分。该技术有望在临床应用中提供更全面的EVs表型信息,

提高疾病诊断和治疗预后的准确性。

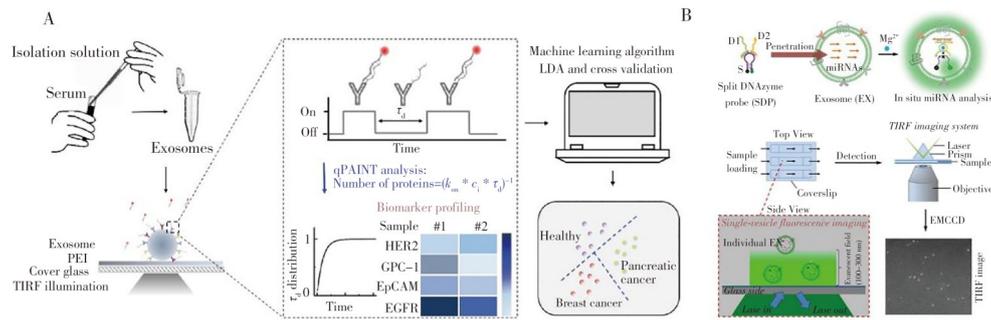


图3 DNA-PAINT对EVs膜蛋白的表征原理图<sup>[43]</sup>(A); 基于TIRF成像技术对单个EVs内miRNA的定量检测<sup>[44]</sup>(B)

Fig. 3 The principle of DNA-PAINT for exosomal surface biomarker profiling<sup>[43]</sup>(A);

the scheme of miRNA analysis in single EVs based on TIRF imaging system<sup>[44]</sup>(B)

**2.4.2 其他超分辨荧光显微技术** 除了TIRF技术, 直接随机光学重组显微技术(Direct stochastic optical reconstruction microscopy, d-STORM)<sup>[46-47]</sup>、光激活定位显微镜技术(Photoactivation localization microscopy, PALM)<sup>[47]</sup>和荧光寿命成像技术(Fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM)<sup>[48]</sup>均已成功实现了EVs的单分子荧光成像。近期, McNamara等<sup>[49]</sup>利用d-STORM成功实现了对单个EVs的三维立体表征, 为探究单个EVs的蛋白微结构域等精细结构提供了重要的技术保障。Wong等<sup>[50]</sup>则基于FLIM和荧光共振能量转移原理(Förster resonance energy transfer, FRET)对肺癌细胞EVs上人表皮生长因子受体(Human epidermal growth factor receptor, HER)的二聚化进行表征, 认为HER受体的二聚状态比其本底表达水平可能提供更有价值的诊断与预后信息。尽管上述超分辨荧光显微技术对EVs分泌与摄取机制的探索和EVs精细蛋白结构的表征起到了重要推动作用, 但是它们往往需要配备精良的仪器设备和强大的数据处理软件, 且无法实现对EVs浓度、粒径等的快速表征。

## 2.5 数字化方法

**2.5.1 微液滴数字化方法** 微液滴数字化方法(Droplet digital analysis, DDS)是新近发展起来的可在单颗粒水平对EVs蛋白、核酸进行绝对定量的表征技术。其原理是利用液滴微流控技术将EVs随机分配到大量相互独立的微液滴中, 每个液滴中最多包含一个EVs, 相当于一个独立的微型反应器。例如, 南方医科大学郑磊教授课题组与合作者<sup>[51]</sup>开发的微液滴数字化检测平台ExoELISA, 基于ELISA原理实现了对微液滴中单个EVs的GPC1的表征, 通过对GPC1<sup>+</sup>EVs浓度的绝对定量, 实现了乳腺癌的早期诊断。厦门大学杨朝勇教授课题组<sup>[52]</sup>发展的双适体近距离诱导微液滴数字PCR技术(A dual-target-specific aptamer recognition activated in situ connection system on exosome membrane combined with droplet digital PCR, TRACER)实现了对肿瘤来源(EpCAM<sup>+</sup>)的PD-L1<sup>+</sup>EVs的绝对定量分析。只有当EVs上同时具有EpCAM与PD-L1时, 两条适体探针才能与同一条连接探针杂交并显示荧光。TRACER相比单一靶标识别策略具有更高的特异性, 可实现胰腺癌患者和健康志愿者的100%区分。近期, Yang等<sup>[53]</sup>发展的集微液滴的产生、处理和分析于一体的液滴光流控平台(A droplet-based optifluidic platform)将检测通量提升至传统液滴微流控技术的100倍以上, 每分钟约生成2 000万个微液滴, 将EVs的检测限推进至9 EVs/ $\mu$ L。该技术有望对复杂环境中的稀有EVs亚群进行准确定量, 展现了其在疾病诊断和预后上的临床应用潜力。

**2.5.2 邻近编码技术** 除此之外, 邻近编码技术(Proximity barcoding assay, PBA)<sup>[54]</sup>是新近发展的可实现单个EVs上多种蛋白同时表征的数字化方法。其原理如图4所示, 该技术首先在每种抗体上偶连上不同的DNA编码标签(proteinTags)(图4A), 在与EVs孵育后, 加入粒径与EVs接近、具有随机重复序列(complexTags)的RCA(Rolling circle amplification)产物(图4B)。RCA产物与EVs单一匹配, 经过酶联杂交反应与PCR扩增后, 利用新一代测序技术解析DNA序列中包含的蛋白信息(图4C)。因为每个EVs均有其独特的complexTags, 再结合proteinTags序列信息便可转化为单个EVs的蛋白信息。该方法可实现对单个EVs上超过30种蛋白分子的同时表征, 具有十分重要的临床应用前景。

## 2.6 流式细胞术

前文所述的EVs单颗粒分析技术或对EVs的生物物理性状进行表征, 或对其生物化学性状进行检

测, 均难以实现单个 EVs 多种物理、生化性状的同时、快速分析。FCM 是一种可以对悬液中的细胞或细胞大小的颗粒进行快速定性、定量分析或分选的先技术, 已被广泛应用于 EVs 的单颗粒多参数定量检测<sup>[46,55-58]</sup>。其中, 散射光反映了 EVs 的粒径或颗粒度信息, 而多色荧光标记则可实现 EVs 蛋白、核酸、脂质等生物分子的检测。Cryo-TEM、TEM 和 AFM 的表征结果均表明绝大部分的 EVs 粒径分布在 300 nm 以下<sup>[59]</sup>。van der Pol 等<sup>[60]</sup>对各种商品化流式细胞仪可检测到的 EVs 粒径范围进行评估, 结果表明仅有少数高灵敏度的流式细胞仪 (Apogee A50-Micro、BD Calibur、BD LSRII 和 BD influx) 可实现粒径小于 300 ~ 600 nm 的 EVs 的检测。这说明, 使用流式细胞仪对 EVs 进行分析时, 占绝大多数的小粒径 EVs 的散射光信号会淹没在背景信号中。

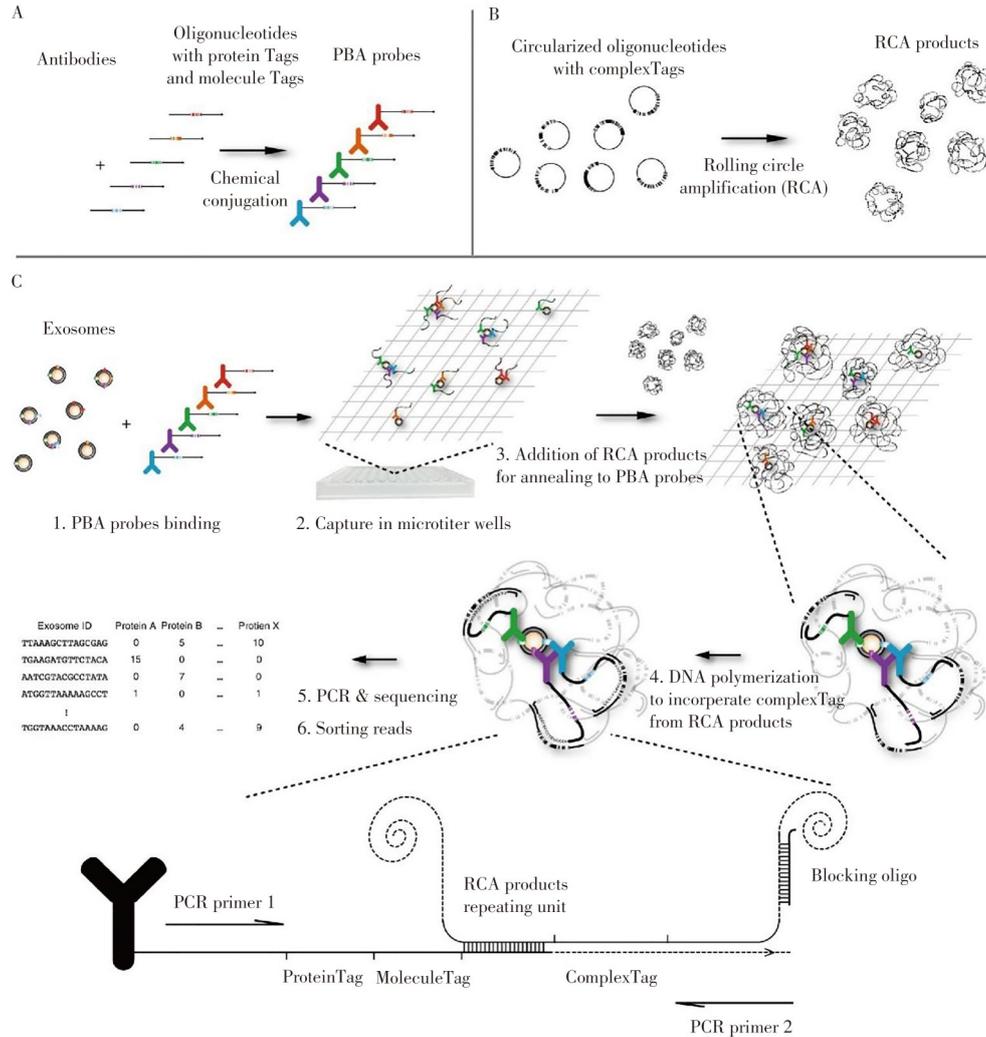


图 4 邻近编码技术(PBA)检测原理图<sup>[54]</sup>; PBA 探针的制备过程(A); RCA 产物的制备过程(B); EVs 膜蛋白的表征流程(C)

Fig. 4 Scheme of PBA on single EV analysis<sup>[54]</sup>: preparation of PBA probes(A); preparation of RCA products(B); the profiling processes of surface proteins on single EVs by PBA(C)

**2.6.1 基于荧光标记的流式细胞术** 在流式检测中, 荧光背景常常低于散射光背景, 荧光触发相较于散射触发具有更高的信噪比。因此, 研究者们常常利用脂膜染料或免疫荧光抗体对 EVs 进行标记, 以荧光信号作为触发信号, 将 EVs 与背景信号区分开来。van der Vlist 等<sup>[55]</sup>对高端流式细胞仪 (BD influx flow cytometer) 进行改造以提升仪器灵敏度, 利用 PKH67 脂膜探针或偶联藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE) 的抗体标记 EVs, 实现了对粒径约为 100 nm 的单个 EVs 的蛋白检测。2016 年, Higginbotham 等<sup>[46]</sup>将分选型流式细胞仪 (BD FACSAria IIIu) 与 STORM 成像技术联用, 实现了对粒径低至 100 nm 的 EVs 的分析表征, 指出表达 EGFR 及其配体 AREG 的 EVs 有望成为结直肠癌早期诊断的有效标志物。2019 年, Ricklefs 等<sup>[61]</sup>开发的成像型流式细胞检测技术 (Imaging flow cytometry, IFCM) 则将流式细胞术与荧光显

显微镜相结合, 不仅具有FCM快速、多参数定量的优势, 也具有荧光显微镜的可视化检测功能, 实现了对单个EVs上CD9、CD63和CD81的多参数定量表征。

**2.6.2 基于信号放大的流式细胞术** 尽管基于荧光触发的流式检测方案提高了FCM对EVs的检测能力, 但目前研究者们尚未发现一种可以实现样本中所有EVs选择性标记的普适性荧光探针。其次, 随着EVs粒径的减小, 颗粒的表面积和内容物的数量均会呈指数级下降, 这导致以上策略无法实现对单个EVs的低拷贝蛋白、核酸等的定量分析。为了解决上述问题, Shen等<sup>[62]</sup>建立了基于信号放大的流式检测方案, 其原理如图5所示: 采用核酸适配体识别EVs表面的特异性抗原, 以该适配体触发杂交链式反应(Hybridization chain reaction, HCR), 形成的DNA纳米结构不仅将单个EVs的粒径扩大到500 nm, 也可结合大量的荧光探针, 实现单个EVs散射信号和荧光信号的同时放大。基于此, 研究人员成功区分了不同乳腺癌细胞来源的EVs, 进一步提高了传统FCM对EVs的单颗粒检测能力。然而, 该法所需EVs浓度较高( $110^{12}$  particle/mL)、扩增流程耗时较长(>8 h), 难以应用于临床研究中。

**2.6.3 纳米流式检测技术** 为了从根本上解决传统FCM由于灵敏度限制, 难以对粒径小于200 nm的生物纳米颗粒进行检测的瓶颈问题, 厦门大学颜晓梅教授课题组将瑞利光散射与鞘流单分子荧光检测技术相结合, 于2009年成功研发具有自主知识产权的纳米流式检测装置(Nano-flow cytometer, nFCM)(图6A), 将散射检测灵敏度较传统FCM提升了4~6个数量级, 荧光检测灵敏度提升了1~2个数量级<sup>[63-64]</sup>, 实现了对细胞上清<sup>[65-66]</sup>、血浆<sup>[65-67]</sup>、尿液<sup>[68]</sup>、泪液<sup>[69]</sup>等体液和细菌<sup>[70]</sup>、牛奶<sup>[71]</sup>等来源的EVs的单颗粒多参数定量表征。2018年, Tian等<sup>[65]</sup>利用nFCM首次实现了对粒径低至40 nm的单个EVs的多参数定量分析。nFCM的分析速率高达每分钟10 000个颗粒, 仅需几分钟便可获得具有高度统计代表性的EVs粒径分布, 其分辨率和准确性媲美Cryo-TEM(图6B)。在蛋白表征方面, 结合免疫荧光标记技术, nFCM可以快速表征表达特定蛋白的EVs亚群在总体EVs中的精确占比, 并可实现单个EVs上特定蛋白拷贝数的准确定量(图6C)。在临床样本分析中, 通过对血浆中CD147<sup>+</sup> EVs的浓度测定, 实现了结直肠癌的早期诊断和预后分析。2020年, Tian等<sup>[67]</sup>使用多种分离纯化方法对血浆EVs进行纯化, 并利用nFCM对其纯化效果进行了评估。结果显示, 与超速离心法相比, EVs提取试剂盒可将血浆中大量的非囊泡组分共分离, 虽然样本颗粒浓度高出2~4个数量级, 但纯度却低得多。近期, Liu等<sup>[66]</sup>使用核酸染料标记EV-DNA, 首次在单颗粒水平揭示了DNA在不同粒径的EVs亚群上的分布情况。Chen等则基于nFCM的单颗粒检测优势, 对EVs上偶联的靶向配体的修饰效果<sup>[71]</sup>和不同载药策略的药物封装效率<sup>[72]</sup>进行了综合评估。

nFCM在EVs的多种理化性质的表征中均展现了突出优势, 由该技术转化的商品化纳米流式检测仪Flow NanoAnalyzer已销售至全球顶尖的科研院所与医疗单位, 应用于EVs的基础研究、临床诊断与药物开发。如美国梅奥诊所王海龙教授课题组<sup>[73]</sup>利用nFCM对不同电刺激条件下大鼠星形胶质细胞分泌的AQP4<sup>+</sup> EVs的浓度、粒径进行表征, 发现胞外电刺激可调节神经细胞EVs的释放及内含物组成, 推进了EVs在帕金森综合征等神经退行性疾病中的生物学应用。近期, 南方医科大学郑磊教授课题组<sup>[74]</sup>基于DNA纳米线诱导的核酸放大技术, 利用nFCM在单颗粒水平实现了对乳腺癌细胞系来源的EVs中miR-1246的定量检测, 体现了nFCM在EV miRNA研究中的潜在应用价值。2020年, 美国Codiak BioScience公司<sup>[75]</sup>利用nFCM在单颗粒水平对EVs蛋白的表征优势, 发现PTGFRN蛋白是其他蛋白融合表达的最佳选择, 成功研制出全球首个外泌体候选药物exoIL-12并投入临床I期试验, 大大加速了EVs的临床应用进程。

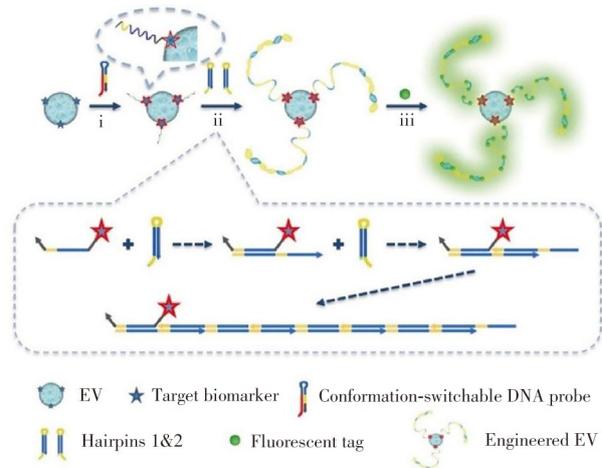


图5 基于靶标引发的DNA纳米结构实现单个EVs分析的流式检测原理<sup>[62]</sup>

Fig. 5 The scheme of single EV flow cytometry approach enabled by target-initiated engineering of DNA nanostructures<sup>[62]</sup>

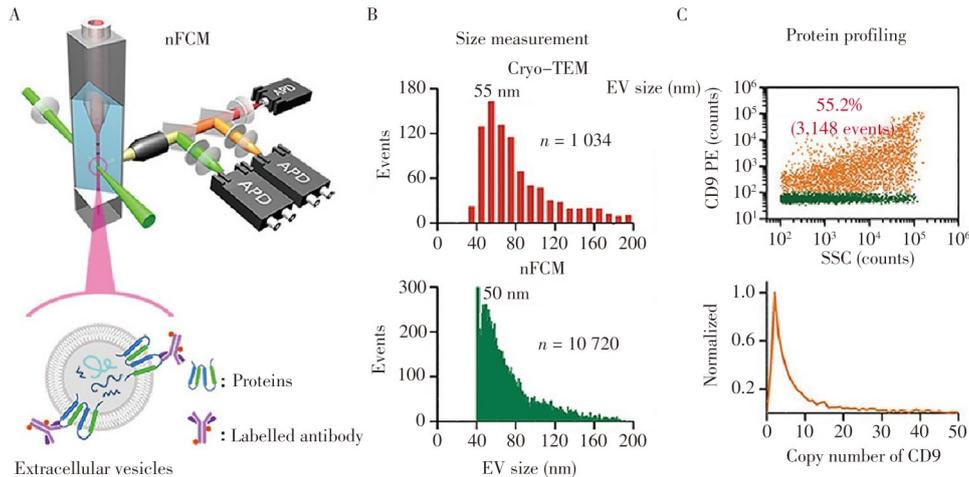


图6 nFCM对EVs的粒径分布与表面蛋白的单颗粒水平表征<sup>[65]</sup>

Fig. 6 Characterization of particle size and surface protein of EVs at the single-particle level via nFCM<sup>[65]</sup>

A. schematic diagram of the laboratory-built nFCM for the analysis of single EVs (nFCM装置图); B. characterization of particle size via nFCM (nFCM对EVs粒径分布的表征); C. characterization of the expression level and copy numbers on single EVs via nFCM (nFCM对单个EVs上CD9蛋白的表达水平及其拷贝数的表征)

### 3 总结与展望

EVs作为一种携带丰富分子信息的新型生物标志物,广泛分布于各种体液中,在临床疾病诊断和治疗领域具有广阔的应用前景。然而, EVs的粒径及其携带的蛋白、核酸、脂质等“货物分子”存在高度的个体差异性和多样性。因此,越来越多的新型单颗粒分析技术应运而生,为精准揭示EVs的个体差异、鉴定EVs的来源与生物学功能提供了重要的技术支撑。但是,这些SVA技术对EVs浓度、粒径及生物分子组成的表征能力不尽相同,且缺乏统一的标准操作指南,因此目前仍需要联合多种SVA技术以实现EVs各种理化性质的全面表征。未来, SVA技术仍需要在以下两个方面进一步发展:第一,发展更加高灵敏、高通量的技术与方法,实现对EVs的快速、高分辨表征;第二,发展自动、便捷、微型化的综合型分析平台,以推进EVs的临床应用进程。我们相信, SVA技术的创新必将加速推动EVs分泌和分选机制的研究、基于EVs的临床诊断标志物的筛选和新型纳米药物的研发,在生命科学领域画下浓墨重彩的一笔!

#### 参考文献:

- [1] Kalluri R, LeBleu V S. *Science*, **2020**, 367(6478): eaau6977.
- [2] Coccozza F, Grisard E, Martin-Jaular L, Mathieu M, Thery C. *Cell*, **2020**, 182(1): 261–262.e1.
- [3] Wang S, Khan A, Huang R R, Ye S Y, Di K L, Xiong T, Li Z Y. *Biosens. Bioelectron.*, **2020**, 154: 112056.
- [4] Bordanaba-Florit G, Royo F, Kruglik S G, Falcon-Perez J M. *Nat. Protoc.*, **2021**, 16(7): 3163–3185.
- [5] Jeppesen D K, Fenix A M, Franklin J L, Higginbotham J N, Zhang Q, Zimmerman L J, Liebler D C, Ping J, Liu Q, Evans R, Fissell W H, Patton J G, Rome L H, Burnette D T, Coffey R J. *Cell*, **2019**, 177(2): 428–445.
- [6] Kim G, Kim M, Lee Y, Byun J W, Hwang D W, Lee M. *J. Control. Release*, **2020**, 317: 273–281.
- [7] Zabeo D, Cvjetkovic A, Lasser C, Schorb M, Lotvall J, Hoog J L. *J. Extracell. Vesicles*, **2017**, 6(1): 1329476.
- [8] Ridolfi A, Brucale M, Montis C, Caselli L, Paolini L, Borup A, Boysen A T, Loria F, van Herwijnen M J C, Kleinjan M, Nejsum P, Zarovni N, Wauben M H M, Berti D, Bergese P, Valle F. *Anal. Chem.*, **2020**, 92(15): 10274–10282.
- [9] Bachurski D, Schuldner M, Nguyen P H, Malz A, Reiners K S, Grenzi P C, Babatz F, Schauss A C, Hansen H P, Hallek M, Pogge von Strandmann E. *J. Extracell. Vesicles*, **2019**, 8(1): 1596016.
- [10] Yekula A, Minciacci V R, Morello M, Shao H, Park Y, Zhang X, Muralidharan K, Freeman M R, Weissleder R, Lee H, Carter B, Breakefield X O, di Vizio D, Balaj L. *J. Extracell. Vesicles*, **2019**, 9(1): 1689784.
- [11] Thane K E, Davis A M, Hoffman A M. *Sci. Rep.*, **2019**, 9(1): 12295.
- [12] Cho S, Yi J, Kwon Y, Kang H, Han C, Park J. *ACS Nano*, **2021**. DOI: 10.1021/acsnano.1c02556.
- [13] Baldwin S, Deighan C, Bandeira E, Kwak K J, Rahman M, Nana-Sinkam P, Lee L J, Paulaitis M E. *Nanomedicine*, **2017**, 13(2): 765–770.
- [14] Kashkanova A D, Blessing M, Gemeinhardt A, Soulat D, Sandoghdar V. *Nat. Methods*, **2022**, 19(5): 586–593.

- [15] Coumans F A, van der Pol E, Boing A N, Hajji N, Sturk G, van Leeuwen T G, Nieuwland R. *J. Extracell. Vesicles*, **2014**, 3: 25922.
- [16] Vogel R, Coumans F A, Maltesen R G, Boing A N, Bonnington K E, Broekman M L, Broom M F, Buzas E I, Christiansen G, Hajji N, Kristensen S R, Kuehn M J, Lund S M, Maas S L, Nieuwland R, Osteikoetxea X, Schnoor R, Scicluna B J, Shambrook M, de Vrij J, Mann S I, Hill A F, Pedersen S. *J. Extracell. Vesicles*, **2016**, 5: 31242.
- [17] Akers J C, Ramakrishnan V, Nolan J P, Duggan E, Fu C C, Hochberg F H, Chen C C, Carter B S. *PLoS One*, **2016**, 11(2): e0149866.
- [18] Tatischeff I, Larquet E, Falcon – Perez J M, Turpin P Y, Kruglik S G. *J. Extracell. Vesicles*, **2012**, 1: 19179.
- [19] Smith Z J, Lee C, Rojalin T, Carney R P, Hazari S, Knudson A, Lam K, Saari H, Ibanez E L, Viitala T, Laaksonen T, Yliperttula M, Wachsmann – Hogiu S. *J. Extracell. Vesicles*, **2015**, 4: 28533.
- [20] Kruglik S G, Royo F, Guigner J M, Palomo L, Seksek O, Turpin P Y, Tatischeff I, Falcon – Perez J M. *Nanoscale*, **2019**, 11(4): 1661 – 1679.
- [21] Penders J, Pence I J, Horgan C C, Bergholt M S, Wood C S, Najer A, Kauscher U, Nagelkerke A, Stevens M M. *Nat. Commun.*, **2018**, 9(1): 4256.
- [22] Penders J, Nagelkerke A, Cunnane E M, Pedersen S V, Pence I J, Coombes R C, Stevens M M. *ACS Nano*, **2021**. DOI: 10.1021/acsnano.1c07075.
- [23] Stremersch S, Marro M, Pinchasik B E, Baatsen P, Hendrix A, de Smedt S C, Loza – Alvarez P, Skirtach A G, Raemdonck K, Braeckmans K. *Small*, **2016**, 12(24): 3292 – 3301.
- [24] Su J. *ACS Photonics*, **2015**, 2(9): 1241 – 1245.
- [25] Liang K, Liu F, Fan J, Sun D L, Liu C, Lyon C J, Bernard D W, Li Y, Yokoi K, Katz M H, Koay E J, Zhao Z, Hu Y. *Nat. Biomed. Eng.*, **2017**, 1: 0021.
- [26] Raghu D, Christodoulides J A, Christophersen M, Liu J L, Anderson G P, Robitaille M, Byers J M, Raphael M P. *PLoS One*, **2018**, 13(8): e0202773.
- [27] Wu X J, Zhao H T, Natalia A, Lim C Z J, Ho N R Y, Ong C J, Teo M C C, So J B Y, Shao H L. *Sci. Adv.*, **2020**, 6(19): eaba2556.
- [28] Pan S, Zhang Y, Natalia A, Lim C Z J, Ho N R Y, Chowbay B, Loh T P, Tam J K C, Shao H. *Nat. Nanotechnol.*, **2021**, 16(6): 734 – 742.
- [29] Joshi G K, Deitz – McElyea S, Liyanage T, Lawrence K, Mali S, Sardar R, Korc M. *ACS Nano*, **2015**, 9(11): 11075 – 11089.
- [30] Daaboul G G, Lopez C A, Chinnala J, Goldberg B B, Connor J H, Unlu M S. *ACS Nano*, **2014**, 8(6): 6047 – 6055.
- [31] Daaboul G G, Gagni P, Benussi L, Bettotti P, Ciani M, Cretich M, Freedman D S, Ghidoni R, Ozkumur A Y, Piotta C, Proserpi D, Santini B, Unlu M S, Chiari M. *Sci. Rep.*, **2016**, 6: 37246.
- [32] Gori A, Romanato A, Greta B, Strada A, Gagni P, Frigerio R, Brambilla D, Vago R, Galbiati S, Picciolini S, Bedoni M, Daaboul G G, Chiari M, Cretich M. *J. Extracell. Vesicles*, **2020**, 9(1): 1751428.
- [33] Li M Z, Soder R, Abhyankar S, Abdelhakim H, Braun M W, Trinidad C V, Pathak H B, Pessetto Z, Deighan C, Ganguly S, Dawn B, McGuirk J, Dunavin N, Godwin A K. *J. Extracell. Vesicles*, **2021**, 10(4): e12067.
- [34] Silva A M, Lazaro – Ibanez E, Gunnarsson A, Dhande A, Daaboul G, Peacock B, Osteikoetxea X, Salmond N, Friis K P, Shatnyeva O, Dekker N. *J. Extracell. Vesicles*, **2021**, 10(10): e12130.
- [35] Arab T, Mallick E R, Huang Y, Dong L, Liao Z, Zhao Z, Gololobova O, Smith B, Haughey N J, Pienta K J, Slusher B S, Tarwater P M, Tosar J P, Zivkovic A M, Vreeland W N, Paulaitis M E, Witwer K W. *J. Extracell. Vesicles*, **2021**, 10(6): e12079.
- [36] Jiang L, Driedonks T A P, Jong W S P, Dhakal S, van den Berg van Saparoea H B, Sitaras I, Zhou R, Caputo C, Littlefield K, Lowman M, Chen M, Lima G, Gololobova O, Smith B, Mahairaki V, Richardson M R, Mulka K R, Lane A P, Klein S L, Pekosz A, Brayton C F, Mankowski J L, Luirink J, Villano J S, Witwer K W. *bioRxiv*, **2022**. DOI: 10.1101/2021.06.28.450181.
- [37] Gebara N, Scheel J, Skovronova R, Grange C, Marozio L, Gupta S, Giorgione V, Caicci F, Benedetto C, Khalil A, Bussolati B. *J. Extracell. Vesicles*, **2022**, 11(5): e12217.
- [38] Khan N Z, Cao T, He J, Ritzel R M, Li Y, Henry R J, Colson C, Stoica B A, Faden A I, Wu J. *Brain. Behav. Immun.*, **2021**, 92: 165 – 183.
- [39] Lee K, Fraser K, Ghaddar B, Yang K, Kim E, Balaj L, Chiocca E A, Breakefield X O, Lee H, Weissleder R. *ACS Nano*, **2018**, 12(1): 494 – 503.
- [40] Liu C, Zhao J X, Tian F, Chang J Q, Zhang W, Sun J S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, 141(9): 3817 – 3821.
- [41] Zhang J L, Shi J J, Zhang H L, Zhu Y F, Liu W, Zhang K X, Zhang Z Z. *J. Extracell. Vesicles*, **2020**, 10(1): e12025.
- [42] He D G, Ho S L, Chan H N, Wang H Z, Hai L, He X X, Wang K M, Li H W. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(4): 2768 – 2775.
- [43] Chen C, Zong S F, Liu Y, Wang Z Y, Zhang Y Z, Chen B, Cui Y P. *Small*, **2019**, 15(43): e1901014.
- [44] He D G, Wang H Z, Ho S L, Chan H N, Hai L, He X X, Wang K M, Li H W. *Theranostics*, **2019**, 9(15): 4494 – 4507.

- [45] Zhou J, Wu Z R, Hu J, Yang D W, Chen X Y, Wang Q, Liu J, Dou M, Peng W J, Wu Y Y, Wang W H, Xie C J, Wang M, Song Y L, Zeng H S, Bai C X. *Sci. Adv.*, **2020**, 6(47): eabc1204.
- [46] Higginbotham J N, Zhang Q, Jeppesen D K, Scott A M, Manning H C, Ochieng J, Franklin J L, Coffey R J. *J. Extracell. Vesicles*, **2016**, 5: 29254.
- [47] Polanco J C, Li C, Durisic N, Sullivan R, Gotz J. *Acta Neuropathol. Commun.*, **2018**, 6(1): 10.
- [48] Saari H, Lisitsyna E, Rautaniemi K, Rojalín T, Niemi L, Nivaro O, Laaksonen T, Yliperttula M, Vuorimaa – Laukanen E. *J. Control. Release*, **2018**, 284: 133 – 143.
- [49] McNamara R P, Zhou Y, Eason A B, Landis J T, Chambers M G, Willcox S, Peterson T A, Schouest B, Maness N J, MacLean A G, Costantini L M, Griffith J D, Dittmer D P. *J. Extracell. Vesicles*, **2022**, 11(3): e12191.
- [50] Wong F, Coban O, Weitsman G, Ng T. *Converg. Sci. Phys. Onc.*, **2017**, 3: 013004.
- [51] Liu C C, Xu X N, Li B, Situ B, Pan W L, Hu Y, An T X, Yao S H, Zheng L. *Nano Lett.*, **2018**, 18(7): 4226 – 4232.
- [52] Lin B Q, Tian T, Lu Y Z, Liu D, Huang M J, Zhu L, Zhu Z, Song Y L, Yang C Y. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(14): 7582 – 7586.
- [53] Yang Z, Atiyas Y, Shen H, Siedlik M J, Wu J, Beard K, Fonar G, Dolle J P, Smith D H, Eberwine J H, Meaney D F, Issadore D A. *Nano Lett.*, **2022**, 22(11): 4315 – 4324.
- [54] Wu D, Yan J H, Shen X, Sun Y, Thulin M, Cai Y L, Wik L, Shen Q J, Oelrich J, Qian X Y, Dubois K L, Ronquist K G, Nilsson M, Landegren U, Kamali – Moghaddam M. *Nat. Commun.*, **2019**, 10(1): 3854.
- [55] Nolte-’t Hoen E N, van der Vlist E J, Aalberts M, Mertens H C, Bosch B J, Bartelink W, Mastrobattista E, van Gaal E V, Stoorvogel W, Arkesteijn G J, Wauben M H. *Nanomedicine*, **2012**, 8(5): 712 – 720.
- [56] Choi D, Montermini L, Jeong H, Sharma S, Meehan B, Rak J. *ACS Nano*, **2019**, 13(9): 10499 – 10511.
- [57] Laurenzana I, Trino S, Lamorte D, Girasole M, Dinarelli S, de Stradis A, Grieco V, Maietti M, Traficante A, Statuto T, Villani O, Musto P, Sgambato A, de Luca L, Caivano A. *Int. J. Nanomed.*, **2021**, 16: 3141 – 3160.
- [58] Yang H C, Rhee W J. *J. Clin. Med.*, **2021**, 10(2): 319.
- [59] van der Pol E, Coumans F A, Grootemaat A E, Gardiner C, Sargent I L, Harrison P, Sturk A, van Leeuwen T G, Nieuwland R. *J. Thromb. Haemost.*, **2014**, 12(7): 1182 – 1192.
- [60] van der Pol E, Sturk A, van Leeuwen T, Nieuwland R, Coumans F, group I – S – V W. *J. Thromb. Haemost.*, **2018**, 16(6): 1236 – 1245.
- [61] Ricklefs F L, Maire C L, Reimer R, Dührsen L, Kolbe K, Holz M, Schneider E, Rissiek A, Babayan A, Hille C, Pantel K, Krasemann S, Glatzel M, Heiland D H, Flitsch J, Martens T, Schmidt N O, Peine S, Breakefield X O, Lawler S, Chiocca E A, Fehse B, Giebel B, Gorgens A, Westphal M, Lamszus K. *J. Extracell. Vesicles*, **2019**, 8(1): 1588555.
- [62] Shen W, Guo K Z, Adkins G B, Jiang Q S, Liu Y, Sedano S, Duan Y K, Yan W, Wang S E, Bergersen K, Worth D, Wilson E H, Zhong W W. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, 57(48): 15675 – 15680.
- [63] Zhu S B, Yang L L, Long Y, Gao M, Huang T X, Hang W, Yan X M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132(35): 12176 – 12178.
- [64] Zhu S B, Ma L, Wang S, Chen C X, Zhang W Q, Yang L L, Hang W, Nolan J P, Wu L N, Yan X M. *ACS Nano*, **2014**, 8(10): 10998 – 11006.
- [65] Tian Y, Ma L, Gong M F, Su G Q, Zhu S B, Zhang W Q, Wang S, Li Z B, Chen C X, Li L H, Wu L N, Yan X M. *ACS Nano*, **2018**, 12(1): 671 – 680.
- [66] Liu H S, Tian Y, Xue C F, Niu Q, Chen C, Yan X M. *J. Extracell. Vesicles*, **2022**, 11(4): e12206.
- [67] Tian Y, Gong M F, Hu Y Y, Liu H S, Zhang W Q, Zhang M M, Hu X X, Aubert D, Zhu S B, Wu L N, Yan X M. *J. Extracell. Vesicles*, **2020**, 9(1): 1697028.
- [68] Liu H S, Yuan W L, Chen Y Y, Chen C, Tian Y, Yan X M. *Chin. J. Anal. Chem.* (刘海生, 袁文理, 陈永钰, 陈晨, 田野, 颜晓梅. 分析化学), **2020**, 48(10): 1305 – 1314.
- [69] Liu H S, Yuan W L, Pang Q S, Xue C F, Yan X M. *Talanta*, **2022**, 239: 123089.
- [70] Niu Q, Tian Y, Wu M K, Zhang Y H, Chen C, Yan X M. *Chin. J. Anal. Chem.* (牛倩, 田野, 吴明凯, 张宇豪, 陈晨, 颜晓梅. 分析化学), **2021**, 49(5): 733 – 742.
- [71] Chen C X, Sun M D, Liu X, Wu W J, Su L Y, Li Y M, Liu G, Yan X M. *Nanoscale*, **2021**, 13(5): 3061 – 3069.
- [72] Chen C X, Sun M D, Wang J L, Su L Y, Lin J J, Yan X M. *J. Extracell. Vesicles*, **2021**, 10(13): e12163.
- [73] Wang Y, Melvin R, Bemis L T, Worrell G A, Wang H L. *bioRxiv*, **2019**. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/566448>.
- [74] Zhang Y, Wu Y, Luo S H, Yang C, Zhong G Z, Huang G N, Zhang X H, Li B, Liu C C, Li L, Yan X H, Zheng L, Situ B. *ACS Sens.*, **2022**, 7(4): 1075 – 1085.
- [75] Dooley K P, Harrison R A, McConnell R E, Xu K, Houde D J, Ross N, Haupt S, Kulman J D, Williams D E. US Patent, 10561740 B2. **2020**.