

特殊样本服务之外泌体蛋白组学

外泌体在分泌细胞和受体细胞间的穿梭介导了细胞间的生物分子传递，是不同组织细胞间信息沟通的重要媒介，外泌体通过携带来自分泌细胞的多种RNA，蛋白和脂成分，参与广谱的生理和病理过程，包括炎症反应、肿瘤转移、心血管疾病等。

外泌体中蛋白质是参与疾病发生、发展的重要部分。经质谱鉴定发现不同来源外泌体携带了4400余种特异性蛋白质。而蛋白质差异表达是区分不同来源外泌体的重要特点也是研究外泌体的重要途径。但是，随着蛋白质组学技术的快速更新，外泌体特异蛋白质的研究将具有巨大的前景。

外泌体的分离纯化

外泌体的分离和纯化是外泌体蛋白质组学研究的前提。外泌体的提取方法包括TiO₂富集法、超速离心法和试剂盒法等，每种方法各有其优缺点，方法的不同对所提纯的外泌体大小，形态，密集程度等有所影响。

TiO₂富集法：外泌体在TiO₂表面化学吸附的驱动力是磷脂双分子层上的磷酸基团和TiO₂之间的配位键。由于磷脂双分子层的柔韧性，可以弯曲以促进与TiO₂表面的多位点相互作用，因此可以实现特定而牢固的结合。由于其简单性和高度的亲和力，这种基于共价结合的选择性富集方法，具有富集效率高，非特异性吸附少，样品处理时间短等方面的优势。

超速离心法：超速离心分离外泌体是目前使用最为广泛的一种方法，也是目前公认的金标准。其原理是根据外泌体与细胞不同组分的沉降系数不同，利用不同强度离心力使样品中死亡细胞、细胞碎片、细胞器等组分被分离出去，然后获得外泌体及部分受到污染的蛋白，用PBS再次重悬清洗离心后即可获得实验所需外泌体。超速离心的优点是能够大量处理样本，且与其他方法相比提取的外泌体形态及后续的外泌体鉴定与经典文献描述相似，因此是目前公认的提取外泌体最有效可靠的方法。

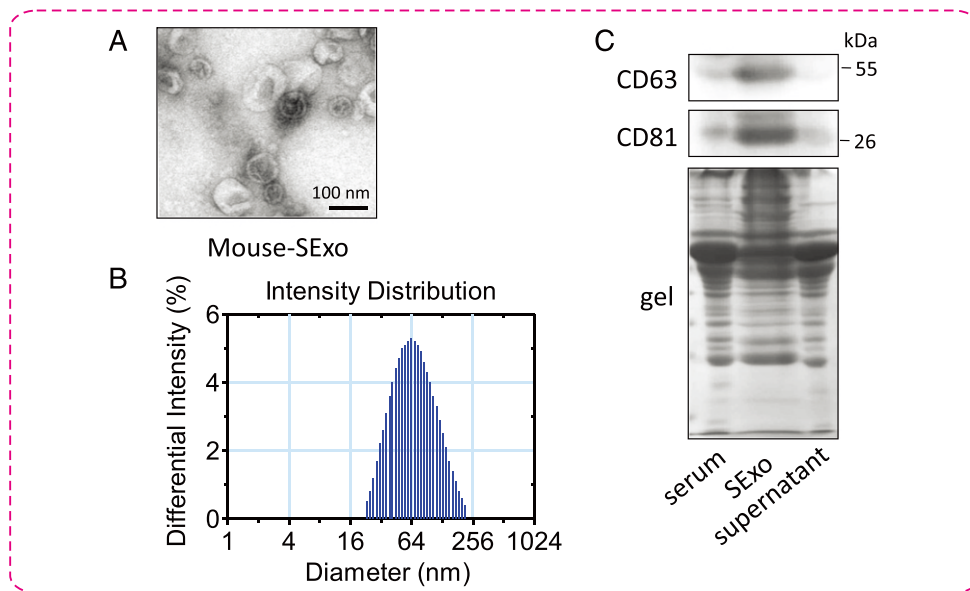
细胞样本：细胞样本的培养基使用量取决于细胞系以及培养状况，细胞系不同外泌体的释放量有很大差别，外泌体释放量高的细胞系几毫升培养液就足够；释放量低的则需要上百毫升。一般来说一个普通的细胞系，用超离分离外泌体，预实验（摸索条件）起始培养量最好50ml以上（直接正式实验建议100-500ml）。细胞培养过程中可以使用无外泌体血清培养基培养，也可以使用含有外泌体的血清培养细胞到一定密度（70-80%），然后吸去培养液，PBS洗数次之后换无血清培养液进行培养（建议无血清培养48h后收集细胞上清）。

血液样本：目前认为血清中外泌体的含量还是很高的，用促凝管或者抗凝管收集全血3000rpm 4℃离心10min，取上清，液氮速冻，保存于-80℃，一般需要3-5ml的血浆/血清样本。

试剂盒法：近年出现了各种用于分离纯化外泌体的商品化试剂盒，目前最常用的是由SystemBioSciences (SBI) 研发的EXOQuick试剂盒，该系列的试剂是基于多聚体形式的Exosome提取试剂，形成类似于网状结果，将一定直径的微泡捕获出来，快速有效的提取各种体液样本中Exosome。

外泌体的表征

2015国际细胞外囊泡协会指南中给定了这三个实验联合鉴定外泌体的方法。三个实验是相互佐证的使用电镜来观察你的样品中是否有与外泌体相似的经典结构，有经典结构说明你的样品中有外泌体或者与外泌体类似的如溶酶体、蛋白聚团、支原体等结构；纳米颗粒追踪分析技术(nanoparticle tracking analysis, NTA)检测外泌体大小以及数量；WB检测发现样品中具有外泌体的标志物，那就一定程度上排除了溶酶体、蛋白聚团、支原体等情况。



三种方法鉴定纯化的外泌体：A.电镜；B.NTA；C.Weston Blot

外泌体蛋白质组学案例解析

一种基于磷脂双层与TiO₂特异性相互作用的血清外泌体分离新策略

A novel strategy for facile serum exosome isolation based on specific interactions between phospholipid bilayers and TiO₂

研究对象：胰腺癌患者和健康供体 期刊：Chemical Science

影 响 因 子 : 9 . 3 4 6

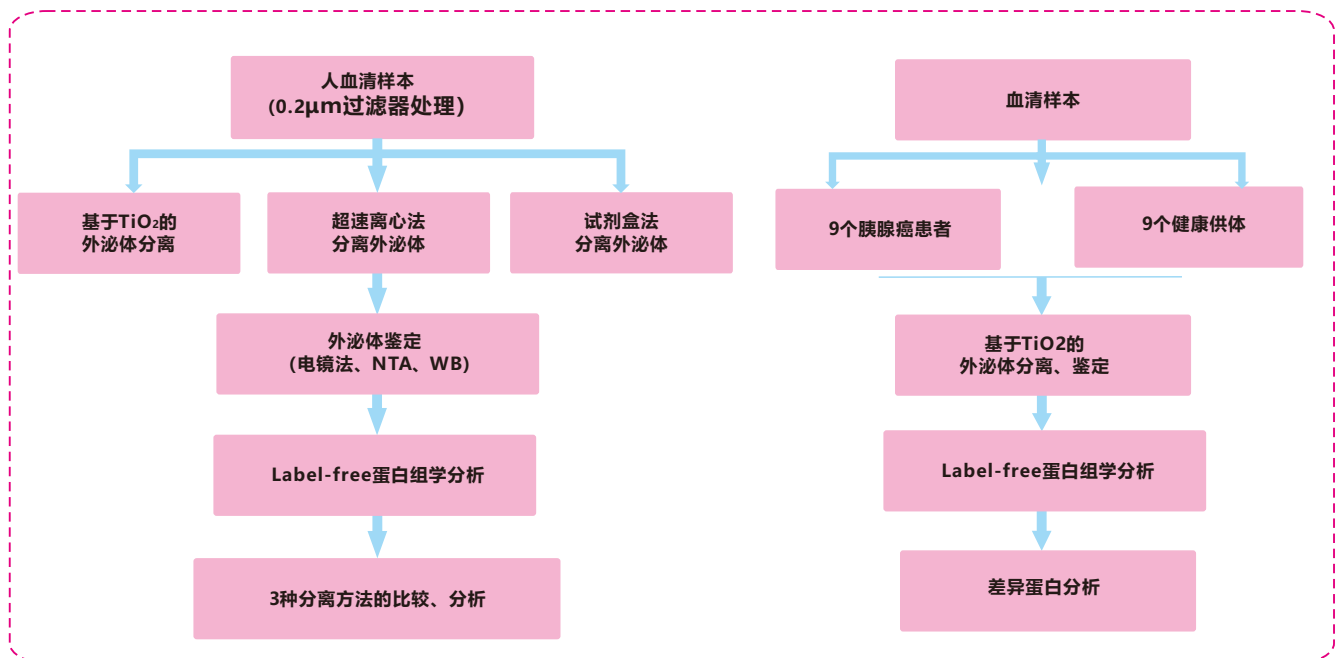
参考文献

Zhang H. Serumexosomes mediate delivery of arginase 1 as a novel mechanism for endothelial dysfunction in diabetes. PNAS. 2018 Jul 2.

背景介绍

外泌体是细胞衍生的，具有磷脂双层封闭结构的囊泡。其在细胞间相互作用中起重要作用并调节许多生物过程。越来越多的证据表明，血清外泌体是癌症早期诊断的潜在生物标志物。为了有助于肿瘤分泌的外泌体的下游分子分析，对纯化的外泌体具有较高要求。然而，目前用于外泌体分离的技术耗时且高度依赖于仪器，并且仅具有有限的特异性和回收率。因此，基础研究和临床应用都需要快速有效的外泌体分离方法。

研究策略



特殊样本服务

结果速递

研究人员对TiO₂吸附参数进行了研究。当TiO₂微球的量从0.5 mg增加到10 mg时，分离效率相应提高，在2 mg TiO₂处达到95.0%的最大效率，而TiO₂量进一步增加则导致分离效率降低。因此，使用2 mg TiO₂进行最佳孵育时间评估。随着孵育时间从30 s延长到5 min，分离效率从53.1%增加到93.4%。当孵育时间延长至10 min时，分离效率会略微提高至95.5%。基于对时间要求和分离效率的综合考虑，选择5 min作为最佳孵育时间。

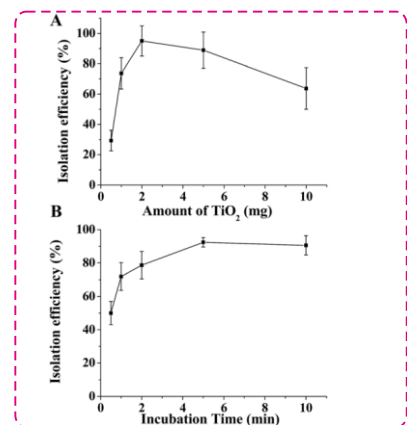


图1. 外泌体分离条件的优化

为了证明基于TiO₂的外泌体分离策略的可行性，研究人员将其进一步应用于人血清样品，并通过蛋白质组分析将其与传统方法（超速离心和共沉淀试剂盒）进行了比较分析。用TiO₂从3个生物重复的100 μL血清样品中分离的外泌体中共鉴定到384个蛋白，明显高于超速离心法（228个蛋白）和商业共沉淀试剂盒法（252个蛋白）所测得的结果。总而言之，与目前可用的人类血清外泌体分析方法相比，基于TiO₂的策略显示出更好的外泌体分离效率并可减少非特异性蛋白质的吸附。

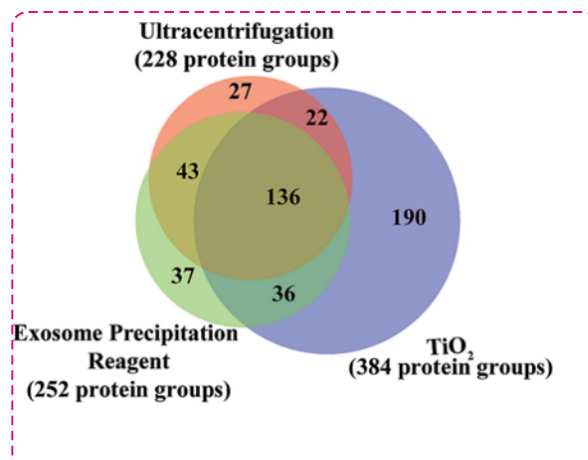


图2. 三种方法比较的韦恩图

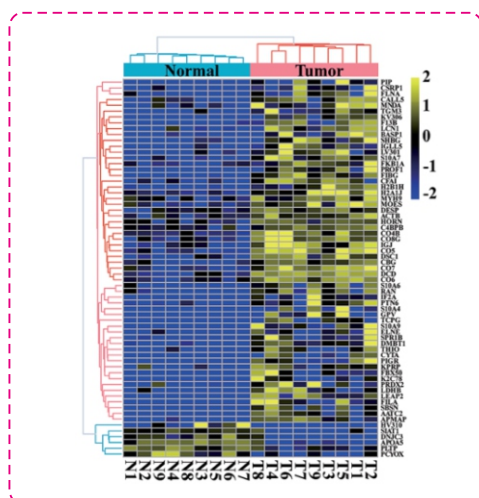


图3. 聚类热图

使用基于TiO₂的策略，从9位健康供体和9位胰腺癌患者的血清样本中分离出外泌体。从健康组和胰腺癌组中共鉴定到433和581个血清外泌体蛋白。与健康组相比，胰腺癌组中鉴定出59种上调蛋白和6种下调蛋白。使用65种差异蛋白的表达数据，通过无监督的层次聚类分析将来自两组的样品重新分组。如预期的那样，胰腺癌组和健康组可以很好地分开，这表明使用外泌体蛋白谱进行胰腺癌患者生物标志物筛选的潜力。

该研究通过利用TiO₂与外泌体脂质双层上的磷酸基团的特异性相互作用，从人血清中简单快速地分离外泌体。这一策略利用了高度亲和力的结合，模型外泌体可以可逆地分离。下游表征和蛋白质组分析表明，该分离方法具有高回收率（93.4%），耗时短（5分钟内）的特性。最后通过比较胰腺癌患者和健康供者的血清外泌体，蛋白质组学分析表明，许多差异表达的蛋白质与癌症的发生和发展密切相关，这表明该策略有可能用于大规模基于外泌体的生物标志物筛选，并用于癌症诊断。

参考文献

Gao F, Jiao F, Xia C, et al. A novel strategy for facile serum exosome isolation based on specific interactions between phospholipid bilayers and TiO₂[J]. Chem Sci, 2019, 10:1579-1588.

北京青莲百奥生物科技有限公司

蛋白质组学技术服务

定性蛋白质组学

- 抗体测序
- 精确分子量
- N/C端测序

定量蛋白质组学

- TMT 16标记定量蛋白质组学
- label free非标记定量蛋白质组学
- DIA定量蛋白质组学
- PRM/MRM靶向蛋白质组学
- 多肽/寡肽组学

修饰蛋白质组学

- N/O糖基化修饰蛋白质组学
- 琥珀酰化修饰蛋白质组学
- 二硫键蛋白质组学
- 磷酸化修饰蛋白质组学
- 乙酰化修饰蛋白质组学
- 泛素化修饰蛋白质组学
- 半胱氨酸氧化修饰蛋白质组学

特殊蛋白质组学

- 单细胞蛋白质组学
- 外泌体蛋白质组分析
- 宏蛋白质组分析
- 泛囊泡蛋白质组分析
- 石蜡包埋蛋白质组分析
- 空间蛋白质组分析

代谢组学技术服务

非靶向代谢组学

有机酸类、有机胺类、核苷、离子型样品、核苷酸、多胺、胆汁酸、神经递质、水溶性维生素、抗生素、植物激素

非靶脂质代谢组学

靶向代谢组学

氨基酸、短链脂肪酸、中长链脂肪酸、有机酸、激素类、酰基肉碱类、神经递质、抗生素、胆汁酸、水溶性激素、植物激素

NMR

NGS技术服务

微生物测序

- 宏基因组测序
- 16S/18S/ITS扩增子测序

RNA测序

- mRNA转录组测序
- lncRNA/circRNA/sRNA非编码测序
- 全转录组测序

生物信息分析

生物信息数据挖掘

多组学联合分析方案

- 蛋白+修饰组学联合分析
- 蛋白+转录组学联合分析
- 蛋白+代谢组学联合分析
- 转录+代谢组学联合分析
- 代谢+宏组学联合分析



公司简介

北京青莲百奥生物科技 2013 年成立于中关村生命科学园，由“国家级人才计划”领军人才开创，团队整合多交叉学科高素质人才，于 2018 年获得国家高新技术企业证书。公司拥有完善的设备、先进的仪器，自有独立实验室。公司目前拥有四大业务板块：科研服务、药学服务、转化医学、大数据处理。

青莲百奥同国内外科研院所建立了长期稳步的合作，并有多篇 Nature、Cell 等高影响因子文章发表。现阶段专注于系统生物学，以蛋白质组学及代谢组学为技术核心，同时涵盖高通量测序等科研服务，未来将致力于临床检测、医学服务等人类健康产业。青莲百奥将依靠自身优秀、专业的服务团队，凭借先进的生物技术及强大的质谱联盟，为科学前沿客户及合作伙伴提供卓越的服务及整体解决方案。

青莲文化：领跑智慧多组学，助力科研新发现

青莲使命：步骤虽繁必不敢省人工，试剂虽贵必不敢减物力

青莲价值观：创新、专业、价值、责任

