

基于 Flex 自动化平台的多体 液胞外囊泡分离及 EV 蛋白质 组学分析流程



北京大学 成都前沿交叉生物技术研究院
Peking University Chengdu Academy for Advanced Interdisciplinary Biotechnologies

作者

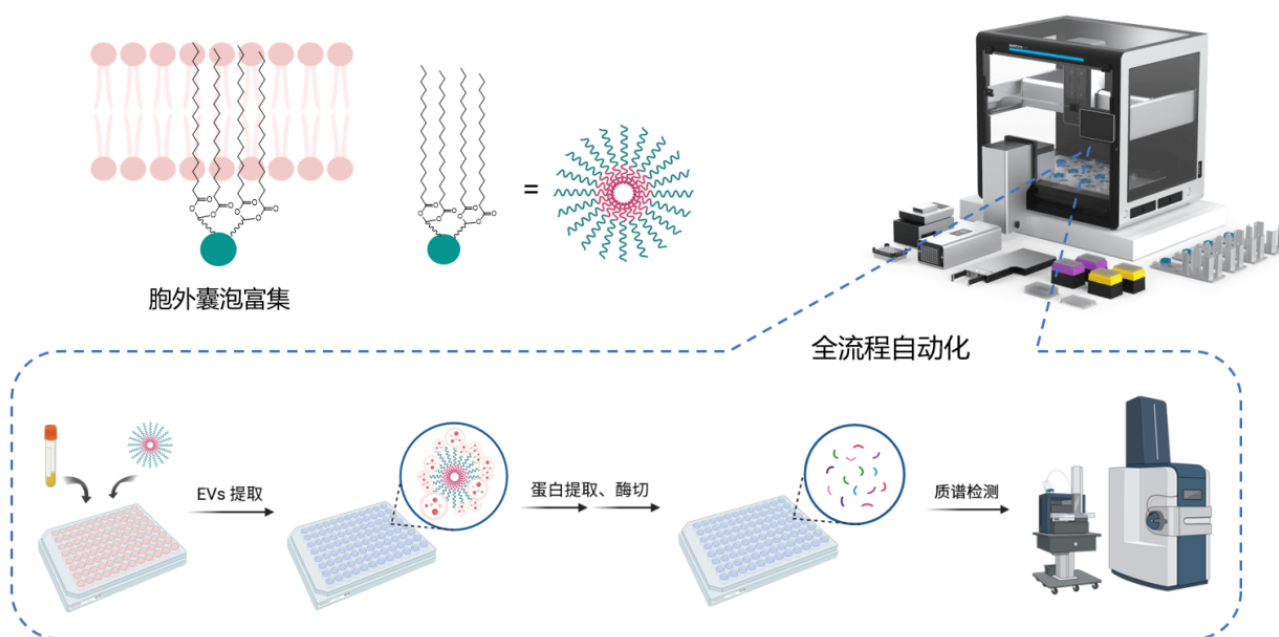
肖伟弟 曾嘉明

北京大学成都前沿交叉生物技术研究院

摘要

细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是疾病诊断与药物研发领域极具价值的生物标志物载体, 相关研究近年来持续受到高度关注。但当前主流的胞外囊泡分离纯化方法普遍存在操作繁琐、检测通量偏低及成本较高等局限, 极大制约了胞外囊泡蛋白质组学技术在大规模临床队列研究中的推广与应用。针对上述技术瓶颈, 北京大学王初教授携其在成都前沿交叉生物技术研究院的团队, 开发了一种 DSPE 功能化磁珠介质, 可在 10 分钟内完成体液样本中细胞外囊泡的高效富集。在此工作基础上, 团队进一步优化并研制出高特异性 DSPE 功能化磁珠体系, 显著提升了细胞外囊泡的分离纯度。

Opentrons Flex 自动化移液平台凭借高精度移液操控、高度灵活的实验流程适配性及稳定的高通量样本处理性能, 在蛋白质组学样本前处理环节中体现出突出的应用优势。王初教授团队将 DSPE 功能化磁珠富集胞外囊泡技术、蛋白质组学样本前处理流程和 Opentrons Flex 自动化平台进行整合, 成功构建并实现了细胞外囊泡蛋白质组学样本的全流程自动化制备体系。该方案显著改善了传统方法在通量与稳定性方面的不足, 显著提高了临床队列样本的分析处理效率, 在疾病相关生物标志物筛选等应用中表现出重要的实用潜力。



实验方法

样本预处理：取适量的体液样本，在 4°C、3000 g 条件下离心 30 min，收集上清用于后续实验。不同样本的用量、蛋白收量和EV蛋白鉴定量等信息见表一。

类型	所需体积	蛋白收量	EV 蛋白鉴定量	EVTop 100鉴定量
血浆	100 μ L	10 μ g	1800	80
血清	100 μ L	15 μ g	1500	70
母乳	100 μ L	12 μ g	1800	75
精浆	100 μ L	24 μ g	3200	90
唾液	200 μ L	7 μ g	2200	80
脑脊液	800 μ L	8 μ g	3500	90
尿液	3 mL	9 μ g	3300	90
细胞培养上清	3 mL	9 μ g	3900	80

表一，不同类型样本的用量、蛋白收量和EV蛋白鉴定量等

自动化胞外囊泡蛋白质组学样本制备（全部由 Opentrons Flex 全自动完成）：

1. 加入体液样本及对应磁珠，于室温振荡孵育10分钟，弃去上清；
2. 磁吸分离beads，使用 PBS 清洗以去除杂蛋白，重复三次；
3. 加入裂解缓冲液，裂解细胞，DTT-IAA；
4. SP3纯化蛋白，洗去杂质；
5. 加入酶切缓冲液，37°C振荡酶切；
6. 收集上清，真空干燥后供后续检测。

质谱检测

重悬样本，取200ng用于质谱分析，本实验使用质谱仪器为timsTOF Pro2。

实验结果

1.稳定性测试

本研究以血浆为例，使用 Opentrons Flex 自动化制备平台进行样本处理，同时人工同步进行制备，最后使用timsTOF Pro2 进行肽段检测。实验分两天进行，每天三个技术重复，共12个样本。两天独立操作的所有样本，蛋白鉴定数目稳定在1700左右，移液工作站的定量CV值中位数保持在6%以内，表现出比人工更高的稳定性。

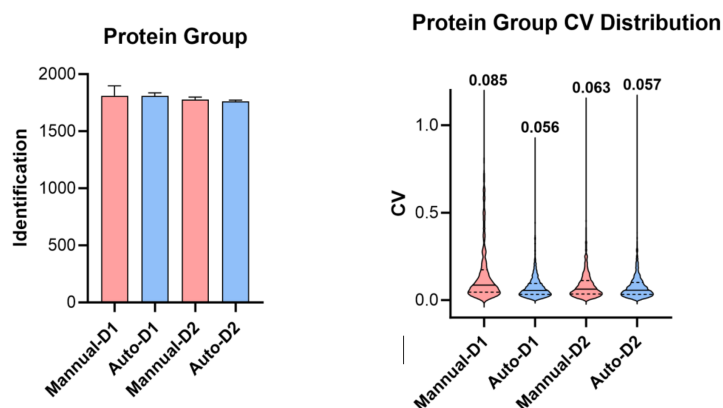
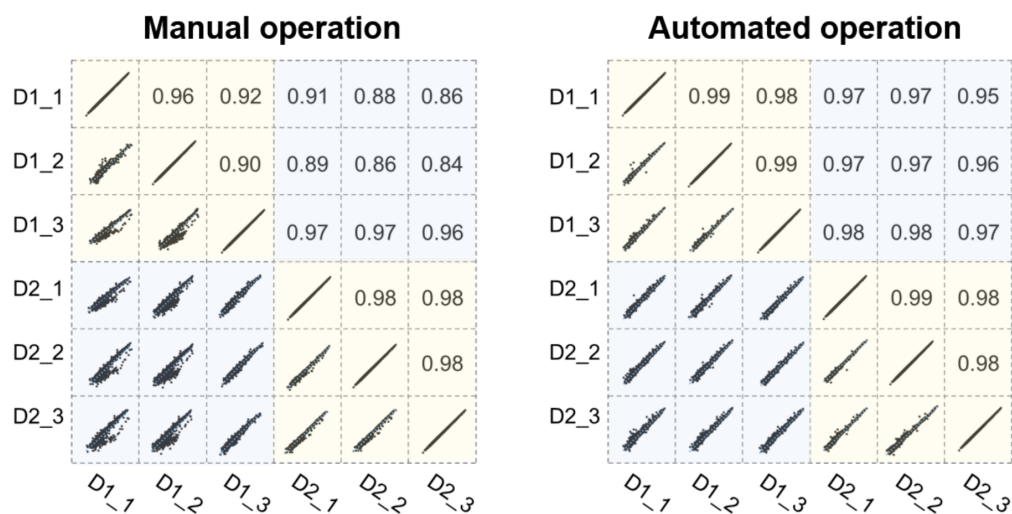


图1 胞外囊泡蛋白质组学数据

2. 重复之间的相关性

如图所示，分别将人工和Opentrons Flex自动化平台的制备结果进行分析，多次重复间的蛋白定量信号进行两两比较，Opentrons Flex自动化平台的R²能够保持在0.95以上，相较人工表现出更高的相关性。



结论

本研究依托 Opentrons Flex 全自动移液工作站，成功构建了一套适用于细胞外囊泡（extracellular vesicles, EVs）蛋白质组学样本制备的全自动化实验平台。该平台和人工处理相比，具备更优秀的运行稳定性，单批次可高效处理96份样本，实现了从EVs富集至质谱检测前处理的“单管闭环”操作，有效降低了样本间交叉污染的发生风险。在项目研发过程中，研究团队利用 QE Plus 质谱仪完成了该制备流程的可行性验证，并通过 timsTOF Pro2 质谱仪明确了该实验流程下 EVs 蛋白质组学的覆盖深度。鉴于糖蛋白在细胞间通讯及免疫调控等生理过程中发挥的关键作用，后续研究计划将该自动化平台与 EV 蛋白的 N 糖基化蛋白质组学分析技术相结合，进一步拓展 EVs 的多维度研究。