基于 Flex 自动化平台的胞外囊泡分离及蛋白质组学分析流程

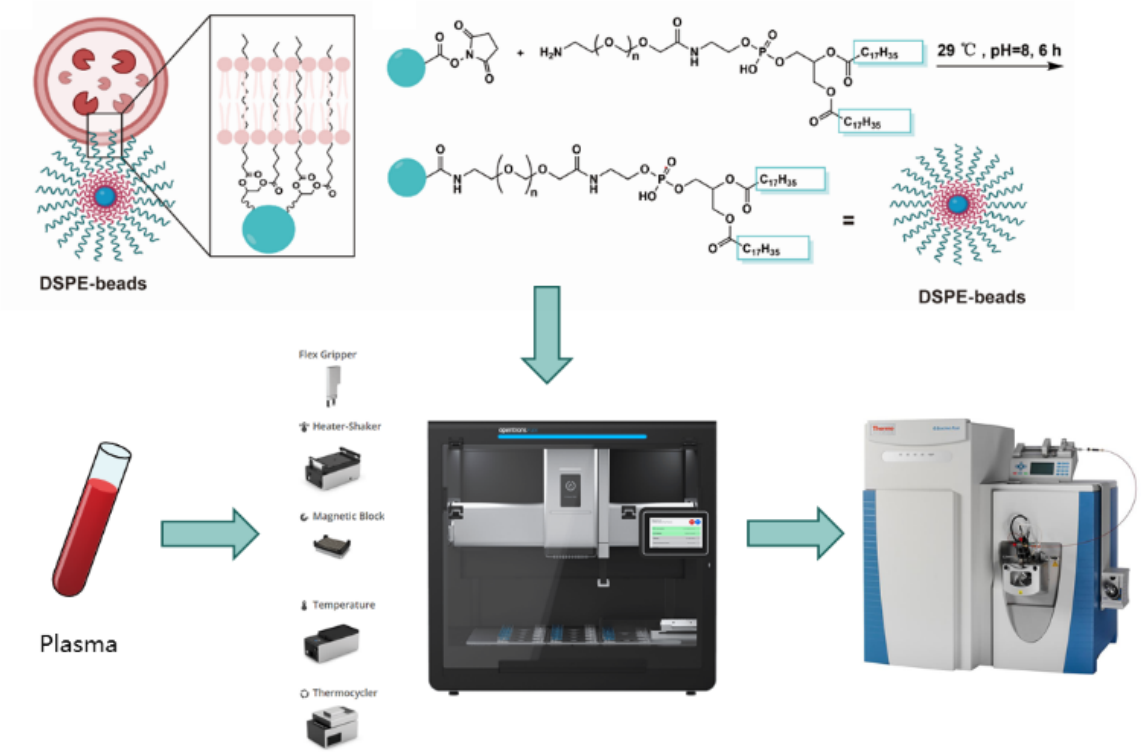
作 者

肖伟弟，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）携带丰富的生物学信息，是疾病诊断与药物研发领域中一类重要的生物标志物载体。然而，目前胞外囊泡的提取方法普遍存在操作流程复杂、通量有限等问题，严重限制了基于胞外囊泡蛋白质组学技术在临床大队列研究中的应用。为了解决以上问题，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，能够在10分钟内实现体液中胞外囊泡的高效富集。

Opentrons Flex 作为一种高性能自动化移液工作站，凭借其精准的移液控制、灵活的流程兼容性以及稳定的批量处理能力，在蛋白质组学样品前处理中展现出显著优势。王初教授团队将胞外囊泡提取磁珠与Opentrons Flex工作平台进行整合，成功实现了胞外囊泡蛋白质组学样本的全流程自动化制备。该方案显著改善了传统方法在通量与稳定性方面的不足，大幅提升了临床队列样本的分析效率，在疾病生物标志物筛选等应用中表现出重要的实用潜力。



胞外囊泡蛋白质组学样本自动化制备流程

材料与方法

样本预处理：

取适量的体液样本，按照要求离心，取上清。不同样本的用量以及离心转速见表一。

表一, 不同类型样本的用量以及预处理离心转速

体液类型	前处理方法	所需体积
血浆	4°C，3000g，30min离心取上清	200 μL
血清	4°C，3000g，30min离心取上清	200 μL
精浆	4°C，3000g，30min离心取上清	200 μL
母乳	4°C，3000g，30min离心取上清	200 μL
尿液	常温，3000g，30min离心×3	3 mL
细胞培养上清	4°C，1000g离心×1，3000g离心×2（皆15min）	3 mL

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）：

- 加入体液样本及对应磁珠，室温震荡孵育10分钟，弃上清；
- 磁吸分离beads，PBS洗去杂蛋白，重复三次；
- 加入裂解缓冲液，裂解细胞，DTT-IAA；
- PAC沉淀蛋白，洗去杂质；
- 加入酶切缓冲液，37°C震荡酶切；
- 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，本实验使用仪器为QE plus。

实验结果

1.稳定性测试

本研究以血浆为例，使用Opentrons Flex工作平台进行样本制备，并使用QE plus进行了样本检测。实验分三天进行，每天做三次技术重复，共9个样本。在三天独立操作的样本间，蛋白鉴定数目稳定在500左右，定量的CV值中位数保持在10%以内，说明本平台具有较高的稳定性。

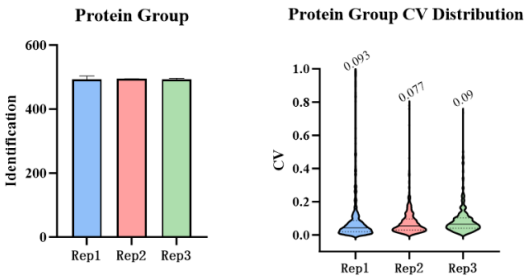
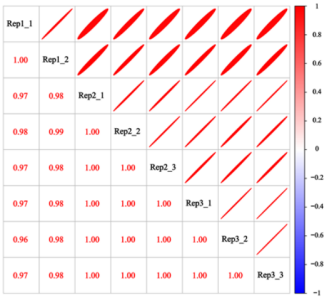
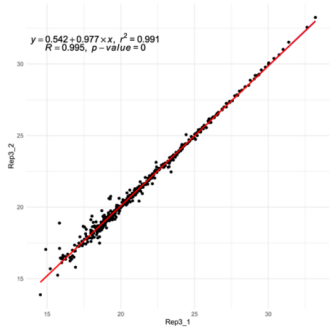


图1 胞外囊泡蛋白质组学数据





2. 重复之间的相关性

如图所示，对多次重复间的蛋白定量信号进行两两比较，R^2 能够保持在0.96以上，表现出极高的相关性。

结论

本研究成功基于Opentrons Flex全自动移液工作站构建了一套用于胞外囊泡（EVs）蛋白质组学样本制备的全自动化平台。该平台运行稳定，单批次可高效处理96例样本，实现了从EVs富集到质谱前处理的“单管闭环”操作，显著降低了样本间交叉污染的风险。在项目初期，我们已在QE Plus质谱仪上完成了可行性验证，后续计划将该平台与更高性能的质谱仪联用，以进一步提升EVs蛋白质组学的覆盖深度和检测能力。