2026 年 3 月 色 谱 Vol.44 No.3
March 2026 Chinese Journal of Chromatography 338~348

研究论文 DOI: 10.3724/SP.J.1123.2025.04034

磁性双功能材料的制备及用于血清中外泌体的捕获和磷肽富集

王子瑞, 郑海娇, 贾 琼*

(吉林大学化学学院, 吉林 长春 130012)

摘要:作为临床样本,血清因其易于获取等优势被广泛应用于疾病研究。血清中的外泌体不仅携带多种蛋白质、核酸等生物活性物质,还可以参与细胞之间的通讯,与多种疾病的发生发展相关联。作为关键的翻译后修饰之一,蛋白质磷酸化通过动态调控细胞信号网络参与疾病发生发展,其在外泌体中的特异性表达为疾病诊断提供了新视角。本论文设计制备了一种基于 2-三氟甲基-4-氨基苯甲酸和 Ti^{4+}的磁性双功能材料(MagphTi^{4+}),通过 2-三氟甲基-4-氨基苯甲酸的疏水作用和 Ti^{4+}的静电作用共同锚定外泌体的双层膜,通过基质的磁响应性质实现外泌体的分离提取。同时,利用材料表面的 Ti^{4+}和磷酸根的螯合作用实现磷肽的富集。通过冷场发射扫描电子显微镜、热重分析、红外光谱、X 射线光电子能谱和 Zeta 电位测定对 MagphTi^{4+}进行了表征。通过冷场发射扫描电子显微镜、透射电子显微镜和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳对外泌体进行了表征,验证了 MagphTi^{4+}对外泌体精准识别和快速分离的能力。以 β-酪蛋白酶解物为标准磷肽模型,建立了磁性固相萃取(MSPE)-质谱检测技术平台,实现了 MagphTi^{4+}对磷肽的高选择性(β-酪蛋白与牛血清白蛋白的质量比为 1∶5 000)和高灵敏度的检测(检出限低至 0.4 fmol/μL)。将该方法用于实际样品分析,实现了对血清外泌体的提取与低丰度磷肽的分离富集。本方法有望用于临床血清样本中外泌体的高通量磷酸化蛋白质组学分析和疾病标志物的筛查。

关键词:血清外泌体;钛离子;磁性固相萃取;磷肽;质谱检测

中图分类号:O658 **文献标识码**:A

Preparation of magnetic bifunctional materials for exosome capture from serum and phosphopeptide enrichment

WANG Zirui, ZHENG Haijiao, JIA Qiong*

(*College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012*)

Abstract: As a clinical sample, serum is widely used in disease research due to the minimally invasive nature of its collection and easy accessibility. Exosomes in serum not only carry various bioactive substances such as proteins and nucleic acids but also participate in intercellular communication, which is closely associated with the development of multiple diseases. As one of the most critical post-translational modifications, protein phosphorylation dynamically regulates cellular signaling networks and participates in disease pathogenesis. However, due to the low abundance of exosomes in serum and the fact that phosphoproteins constitute only 1%–2% of the total proteome, direct analysis of exosomal phosphoproteins from serum faces significant challenges. The specific expression of phosphoproteins in exosomes provides novel perspectives for disease diagnosis. In this study, magnetic bifunctional nanoparticles (MagphTi^{4+}) based on 2-trifluoromethyl-4-aminobenzoic acid and Ti^{4+} were synthesized, which anchor the exosome bilayer membrane through the hydrophobic interactions of 2-trifluoromethyl-4-aminobenzoic acid and the electrostatic interactions of Ti^{4+}, and the magnetic responsiveness ensures the isolation of exosomes. Simultaneously, the

收稿日期:2025-04-30

* **通信联系人**.Tel:0431-85095144,E-mail:jiaqiong@jlu.edu.cn.

基金项目:吉林省教育厅科学技术研究项目(JJKH20241244KJ).

Foundation item: Science and Technology Research Project of Education Department of Jilin Province (No. JJKH20241244KJ).

enrichment of phosphopeptides was achieved by the chelation between Ti^{4+} and phosphate groups. $MagphTi^{4+}$ was characterized by cold field scanning electron microscopy, thermogravimetric analysis, Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy and zeta potential measurement, demonstrating the successful synthesis and functional characteristics of $MagphTi^{4+}$. The precise recognition and rapid separation of exosomes were validated by cold field scanning electron microscopy, transmission electron microscopy and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Using β-casein as a standard phosphoprotein model, a magnetic solid-phase extraction (MSPE)-matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry platform was established, which demonstrated high selectivity (mass ratio of β-casein to bovine serum albumin was 1∶5 000) and sensitivity (detection limit was 0.4 fmol/μL) for phosphopeptide detection. Subsequently, the method was applied to saliva and nonfat milk samples; 11 phosphopeptides were identified in saliva and 20 were identified in nonfat milk, which demonstrates excellent enrichment capability for phosphopeptide detection in real samples. When applied to clinical serum samples, the method successfully achieved the extraction of exosomes in serum and enrichment of phosphopeptides with low abundance. This integrated approach provides a powerful tool for exosome capture and phosphopeptide enrichment from complex biological samples, showing significant potential for high-throughput phosphoproteomic analysis of exosomes from clinical serum and the screening of disease biomarkers. Further application of the method developed in this study holds promise for elucidating the mechanisms of exosome-mediated intercellular transmission of phosphorylation signaling, thereby identifying novel targets related to tumor metastasis and immune escape.

Keywords: serum exosomes; titanium ion; magnetic solid-phase extraction; phosphopeptides; mass spectrometric detection

血液蛋白质组学在后基因组时代的生物医学研究中起着至关重要的作用，在生物标志物研究领域备受关注[1,2]。研究人员通过高通量的蛋白质组学检测技术，可以分析血清样品中的多种蛋白质成分，包括总蛋白质组及蛋白质的翻译后修饰，为新型生物标志物的发现和临床诊断方法的开发提供帮助[3-5]。外泌体是一种运载大量功能性蛋白质的微小囊泡，在体内参与信号转导、肿瘤发生、免疫反应、细胞通讯等生理过程，和多种疾病的发生与进展存在密切关联[6-8]。近年来，血清外泌体蛋白质组学的研究已深入肿瘤微环境调控、疾病标志物筛选及药物靶向递送系统开发等前沿方向[9-11]，成为临床样品分析的热点。作为关键的翻译后修饰之一，蛋白质磷酸化可通过精确调控信号转导、代谢重编程等过程参与调节几乎所有必要的细胞功能，可动态反映机体的病理状态，在疾病的早期诊断与疗效监测中具有显著潜力[12-14]。因此，血清外泌体的磷酸化蛋白质组学研究具有重要的临床意义。

随着色谱-质谱联用技术的发展，该技术已成为研究外泌体蛋白质组学的强有力工具之一。然而，由于血清中外泌体含量和发生磷酸化修饰的蛋白质含量（仅占蛋白质总量的 1%~2%）均极低，因此难以实现未经前处理步骤的样品的直接检测。为了解决这一问题，一些复杂样品中的外泌体提取方法和蛋白质磷酸化富集手段应运而生[15-17]。传统的外泌体分离方法主要有尺寸排阻法、超速离心法、免疫亲和法。这些方法虽然可以实现外泌体的提取，但仍存在一些问题，如超速离心法耗时长且回收率不足 30%[18]；免疫亲和法成本高、洗脱效率低等[19]。结合磁性分离介质和特异性识别基团选择性捕获

引用本文：王子瑞，郑海娇，贾琼. 磁性双功能材料的制备及用于血清中外泌体的捕获和磷肽富集. 色谱，2026，44(3)：338-348.
WANG Zirui, ZHENG Haijiao, JIA Qiong. Preparation of magnetic bifunctional materials for exosome capture from serum and phosphopeptide enrichment. Chinese Journal of Chromatography, 2026, 44(3): 338-348.

外泌体是一种有效的策略[20-22]，而开发新型外泌体磁分离技术是提升检测准确度的突破口。由于外泌体具有疏水的磷脂双分子层且膜表面带有负电荷，近年来，开发带正电的磁性疏水材料对外泌体进行捕获已成为研究热点[23-25]。

目前，蛋白质磷酸化的富集手段主要包括金属氧化物亲和色谱法（MOAC）、离子交换色谱法（IEX）、固定化金属离子亲和色谱法（IMAC）[26-28]。其中，IMAC 技术由于具有简单、实用等优点，已成为磷肽富集最重要的方法[29]。其富集机理为在酸性条件下通过金属离子与磷酸基团的螯合作用捕获磷肽，而捕获的磷肽可以在碱性条件下被洗脱[30]。近年来，一些研究者将 IMAC 技术用于外泌体磷酸化蛋白质组的分析，取得了令人满意的结果。例如，2023 年，Tao 等[31]将 Ti^{4+} 与八聚精氨酸共修饰于磁珠表面，开发出用于体液中细胞外囊泡分离与细胞外囊泡中磷肽原位富集（EVTOP）的一体化平台，实现了尿液、血清、脑脊液等多种复杂生物流体中外泌体捕获、裂解、酶解与磷肽富集的全流程集成，最大程度上减小了样品损失，从 100 μL 脑脊液中鉴定出 1 249 种磷肽。2024 年，Fang 等[32]将 Ti^{4+} 与核酸修饰在磁珠表面，开发的外泌体高效分离平台可在 5 min 内以 92% 的回收率实现对模型外泌体的高效捕获，并从 100 μL 血清样品中鉴定出了 320 种外泌体蛋白质。

针对外泌体膜的疏水性、负电性与磷肽的负电性，本研究设计了一种新型基于 Ti^{4+} 的疏水性磁性纳米颗粒（MagphTi^{4+}），通过 2-三氟甲基-4-氨基苯甲酸（$CF_3C_6H_3$-2-(NH_2)CO_2H）的疏水作用和 Ti^{4+} 的静电作用实现了外泌体的捕获，通过 IMAC 实现了磷肽的富集。首先，通过硅酸四乙酯（TEOS）和 3-氨丙基三乙氧基硅烷（APTES）对 Fe_3O_4 进行硅烷化，得到氨基修饰的核壳型磁性基质。其次，通过 1-（3-二甲氨基丙基）-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（EDC）/*N*-羟基丁二酰亚胺（NHS）活化过程将 2-三氟甲基-4-氨基苯甲酸偶联到基质表面；最后，通过 Ti^{4+} 与三氟甲基分子间的作用将 Ti^{4+} 螯合到材料表面。利用 MagphTi^{4+} 双功能磁性材料的疏水性和正电性实现复杂样品中外泌体的特异性捕获和快速分离。同时，利用 MagphTi^{4+} 表面的 Ti^{4+} 实现对磷肽的特异性富集。以标准磷酸化蛋白酶解所得到的磷肽评价方法的灵敏度和选择性，以牛奶和唾液样品评价方法在复杂样品分析中对磷肽的富集能力。最后，将此方法用于血清外泌体的分离和外泌体磷肽的富集分析中，综合考察了本方法在实际样品分析中的适用性。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

SU8020 型冷场发射扫描电镜（SEM）、HT7820 型透射电子显微镜（TEM）（Hitachi，Japan）；Q500 型热重分析仪（TGA，TA，USA）；SQNicolet IS5 型傅里叶变换红外光谱仪（FTIR，Bruker，Germany）；ESCALAB250 型 X 射线光电子能谱仪（XPS，Thermo，USA）；Zetasizer Nano ZS ZEN3600 型 ZETA 电位和纳米粒度分析仪（Zeta，Malvern，Britain）；JY-SCZ2 型电泳仪（SDS-PAGE，北京君意，中国）；AB Sciex 5800 型基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱仪（MALDI-TOF MS，AB SCIEX，USA）。

TEOS（纯度≥98%）、2-三氟甲基-4-氨基苯甲酸（纯度≥98%）、硫酸氧钛-硫酸水合物（$TiOSO_4\cdot xH_2SO_4\cdot xH_2O$，纯度≥93%）、考马斯亮蓝（纯度≥70%）、乙腈（纯度 99%，ACN）、3-氨丙基三乙氧基硅烷（纯度≥98%）、*N*-羟基丁二酰亚胺（纯度≥98%）、2，5-二羟基苯甲酸（DHB，纯度 99%）、尿素（H_2NCONH_2，纯度 99%）、硫脲（CH_4N_2S，纯度 99%）、二硫苏糖醇（DTT，纯度≥98%）、碘乙酰胺（IAA，纯度≥98%）、三氟乙酸（TFA，纯度 99%）、苯甲基磺酰氟（PMSF，纯度≥98%）、甲酸（FA，纯度≥98%）、1-（3-二甲氨基丙基）-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（纯度≥98%）PBS 溶液（pH 7.2~7.4）、磷酸（纯度 85%）购于 Aladdin 试剂（上海）公司；胰蛋白酶（trypsin，纯度≥98%）、牛血清白蛋白（BSA，纯度≥98%）、β-酪蛋白（β-casein，纯度 99%）购于 Sigma 试剂有限公司；三氯化铁（$FeCl_3\cdot 6H_2O$，纯度 99%）、醋酸钠（NaAc，纯度≥98%）、盐酸（HCl，纯度 35%）、氨水（$NH_3\cdot H_2O$，纯度 25%）、无水乙醇（EtOH，纯度 99%）、乙二醇（EG，纯度 99%）、三乙胺（纯度 99.5%）、磷钨酸水合物（$H_3O_{40}PW_{12}\cdot xH_2O$，纯度≥99.995%）、氯化钠（NaCl，纯度 99%）、碳酸氢铵（NH_4HCO_3，纯度 99%）、三氯甲烷（$CHCl_3$，纯度 99%）购于北京化学试剂公司。脱脂牛奶样品购于长春本地超市；人血清样本和唾液样本来源于吉林大学中日联谊医院，研究经吉林大学中日联谊医院伦理委员会批准，批准号为 2021113000。

1.2　实验方法

1.2.1　MagphTi^{4+}的合成

称取 2.6 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 和 5.9 g NaAc 溶于 90 mL EG 中，将溶液转移至反应釜中，于 200 ℃加热 15 h。产物用乙醇和纯水交替冲洗 6 次，磁分离得到 Fe_3O_4 磁性内核[33]。取 400 mg Fe_3O_4 置于含 76 mL 纯水、290 mL 无水乙醇和 2.1 mL 氨水的混合溶液中，以 300 W 功率超声 15 min 使磁球分散均匀，加入 1.9 mL TEOS，于 40 ℃、50 r/min 的条件下搅拌 15 h，磁分离得到硅烷化的磁球（简称 Fe_3O_4-SiO_2）。

取 90 mg Fe_3O_4-SiO_2 置于 22 mL 乙醇中，以 300 W 功率超声 15 min 使其分散均匀，加入 0.65 mL APTES，于 65 ℃、50 r/min 的条件下搅拌 20 h，经磁吸分离得到氨基修饰的磁球（简称 Fe_3O_4-NH_2）[34]。

称取 370 mg 2-三氟甲基-4-氨基苯甲酸，3.0 g EDC 和 2.4 g NHS，溶于 28 mL 纯水，混合均匀后加入 Fe_3O_4-NH_2，于 37 ℃、50 r/min 的条件下搅拌 24 h，经磁吸分离得到 2-三氟甲基-4-氨基苯甲酸修饰的磁性微球（简称 Magph）。

取 370 mg Magph 分散到 30 mL 纯水中，加入 1.3 g 硫酸氧钛-硫酸水合物与 1 μL 浓盐酸（12 mol/L），于 37 ℃、50 r/min 的条件下搅拌 20 h。反复用乙醇和纯水交替清洗产物，经磁分离得到 MagphTi^{4+}[35]。

1.2.2　样品的前处理

在之前工作[36,37]的基础上对实际生物样品处理过程进行改进。在 150 μL 脱脂牛奶样品中加入 300 μL 含有 40 mmol/L NH_4HCO_3 的缓冲溶液，于 4 000 r/min、4 ℃的条件下离心 16 min，上清液于 95 ℃油浴中加热 15 min 使蛋白变性，降至室温后加入 15 μg 胰蛋白酶，于 37 ℃孵育 14 h，将制备的肽段溶液置于冰箱中冷冻备用。

在 100 μL 唾液中加入 400 μL 40 mmol/L NH_4HCO_3 的缓冲溶液，于 4 000 r/min、4 ℃的条件下离心 16 min，取上清液置于冰箱中冷冻备用。

在 100 μL 血清中加入 400 μL 40 mmol/L NH_4HCO_3 的缓冲溶液，于 4 000 r/min、4 ℃的条件下离心 16 min。取 100 μL 上清液，加入到分散有 1 mg MagphTi^{4+} 的 100 μL PBS 缓冲液（pH=7.4）中，于室温孵育 30 min 后，磁吸 30 s 并除去上清液。用 100 μL PBS 缓冲液（pH=7.4）洗涤磁球，重复 3 次。将磁球重悬于 100 μL 含有 2 mol/L 硫脲、8 mol/L 尿素、1 mmol/L PMSF、60 mmol/L DTT 的裂解缓冲溶液中，于 95 ℃油浴中加热 10 min，冷却至室温，加入 10 μg 胰蛋白酶，于 37 ℃孵育 14 h，之后置于冰箱中冷冻备用，以备后续分析。

外泌体 TEM 表征制样：将富集血清外泌体的磁球重悬于 100 μL 50 mmol/L 的三乙胺溶液中，于常温摇晃 30 min 后，磁吸 30 s 并收集上清液。取 5 μL 上清液与 5 μL 2% 磷钨酸溶液混合，常温孵育 10 min，置于铜网，于常温下干燥。

1.2.3　磷肽的富集

取 6.5 mg MagphTi^{4+} 分散于 0.13 mL 含 1% TFA 的 70% 乙腈水溶液中用作磁球分散液。将冷冻备用的样品于常温下融化，取 10 μL 待分析的样品溶液和 10 μL 磁球分散液，加入 80 μL 含 1% TFA 的 70% 乙腈水溶液，超声 5 min 使磁球均匀分散，常温振荡 35 min 后，磁吸 30 s 后分离磁球，用 100 μL 含 1% TFA 的 70% 乙腈水溶液清洗磁球，清洗过程重复 3 次。最后将磁球分散于 25 μL 1% 氨水中，常温振荡 35 min 后，经磁分离收集洗脱液。

1.2.4　MALDI-TOF MS 条件

选用反射正离子模式，离子源的温度为 110 ℃，电喷雾的电压为 2.3 kV，扫描范围为 m/z 1 000~3 500。取 40 mg DHB 溶于 40 mL 含 1% H_3PO_4 的 70% 乙腈水溶液充当基质溶液。将等体积基质溶液和样品溶液均匀混合，取 1 μL 混合均匀的溶液滴于 MALDI 靶板。

2　结果与讨论

2.1　MagphTi^{4+}的合成与表征

图 1 为 MagphTi^{4+}的合成路线图与富集磷肽的流程图。SEM 图像展示了 Fe_3O_4 和 MagphTi^{4+}的形貌和尺寸。如图 2a 所示，Fe_3O_4 形貌呈光滑的球体，其直径约为 267 nm；如图 2b 所示，修饰后的磁性颗粒表面粗糙，颗粒直径尺寸略大于 Fe_3O_4，其直径约为 290 nm。

采用 FTIR 对 Fe_3O_4、Fe_3O_4-NH_2、MagphTi^{4+}进行表征。由图 3a 可见，Fe_3O_4、Fe_3O_4-NH_2、MagphTi^{4+}在 580 和 1 080 cm^{-1} 处存在特征吸收峰，可归属于 O-Fe 键的振动。Fe_3O_4-NH_2 曲线中，在 1 560 cm^{-1} 和 1 261 cm^{-1} 处有归属于 N-H 和 C-N 的吸收峰，证明 APTES 成功修饰在磁球表面。MagphTi^{4+}光谱中，1 123 cm^{-1} 处有归属于 C-F-C 的吸收峰、在

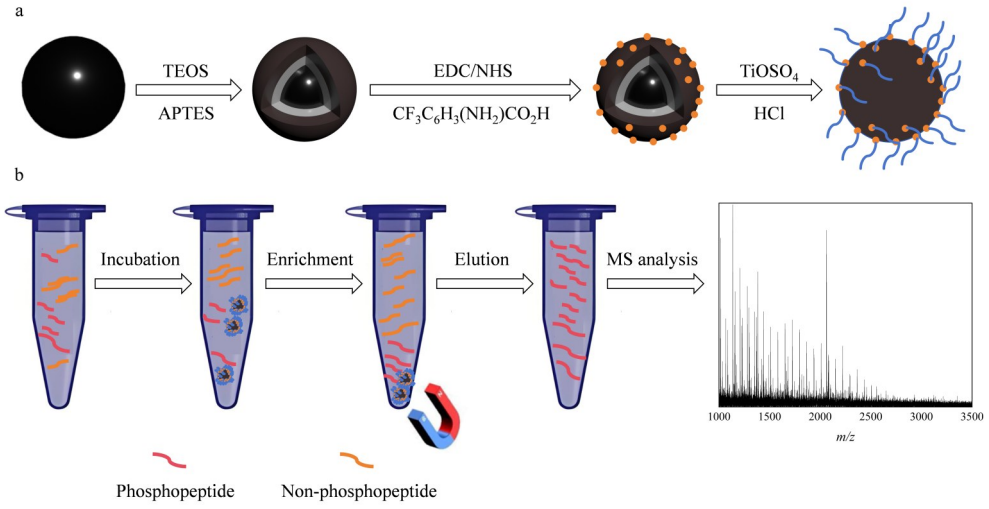


图 1 MagphTi^{4+}的(a)合成路线及其(b)富集磷肽的过程

Fig. 1 (a) Synthetic route of MagphTi^{4+} and (b) workflow of phosphopeptides enrichment by MagphTi^{4+}

TEOS: tetraethyl orthosilicate; APTES: 3-aminopropyltriethoxysilane; EDC: 1-ethyl-3-(3′-dimethylaminopropyl) carbodiimide; NHS: *N*-hydroxysuccinimide.

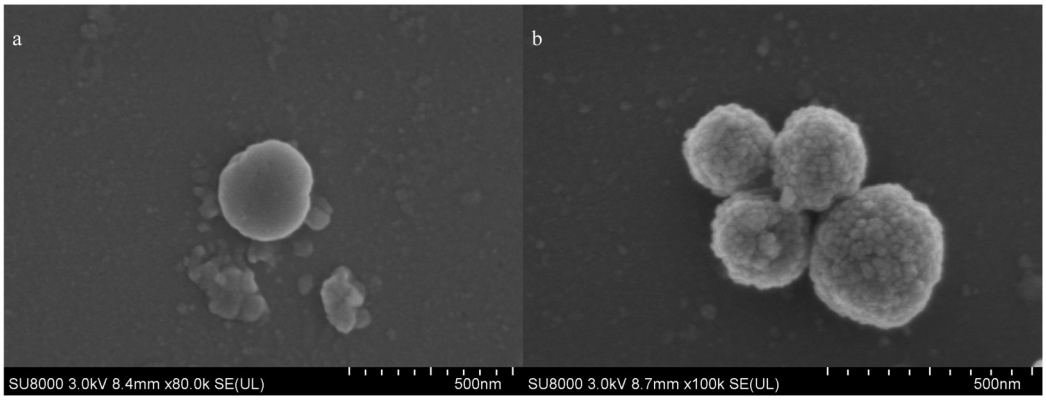


图 2 (a)Fe_3O_4和(b)MagphTi^{4+}的 SEM 图像

Fig. 2 SEM images of (a) Fe_3O_4 and (b) MagphTi^{4+}

3 399 cm^{-1}处有归属于酰胺键的特征吸收峰、在 697 cm^{-1}处有归属于 Ti-F-Ti 的特征吸收峰，说明 MagphTi^{4+}制备成功。

对 Fe_3O_4、Fe_3O_4-NH_2、MagphTi^{4+}进行了 Zeta 电位和 DLS 粒度分析。图 3b 展示了弱酸性条件下 MagphTi^{4+}的表面电荷，相较于 Fe_3O_4和 Fe_3O_4-NH_2，MagphTi^{4+}表面固定有大量 Ti^{4+}，在酸性条件下具有强正电荷，可与带负电的磷肽结合。DLS 分析表明 MagphTi^{4+}在水中的尺寸约为 270 nm。

图 3c 是对 Fe_3O_4、Fe_3O_4-NH_2、MagphTi^{4+}的热重分析结果，相对 Fe_3O_4和 Fe_3O_4-NH_2在完整加热过程中质量的轻微降低，MagphTi^{4+}的重量损失大约为 24.0%，在 30~225 ℃范围内的轻微失重(约 2.5%)是由于水和有机小分子的蒸发；在 300~490 ℃范围内发生了明显的失重(大约 21.5%)，这是因为后修饰基团的分解导致的。以上结果说明 MagphTi^{4+}具有良好的热稳定性。

最后，采用 X 射线光电子能谱对 Fe_3O_4、Fe_3O_4-NH_2、MagphTi^{4+}进行了表征。如图 3d 所示，与未经修饰的 Fe_3O_4对比，经氨基化的磁性材料 Fe_3O_4-NH_2中出现 N 1*s*(400 eV)的特征峰，说明成功修饰 APTES。在 MagphTi^{4+}的图谱中，新出现了 F 1*s*(689 eV)和 Ti 2*p*(459 eV)两个峰，证明了 2-三氟甲基-4-氨基苯甲酸和 Ti^{4+}的成功引入，间接表明了 Ti^{4+}和三氟甲基之间螯合作用的存在。此外，由 SEM 图像可知，硅层厚度(约为 23 nm)高于 XPS 探测深度(<10 nm)，因此，如图 3d 所示，Fe_3O_4-NH_2与 MagphTi^{4+}的 Fe 2*p* XPS 信号几乎完全消失。

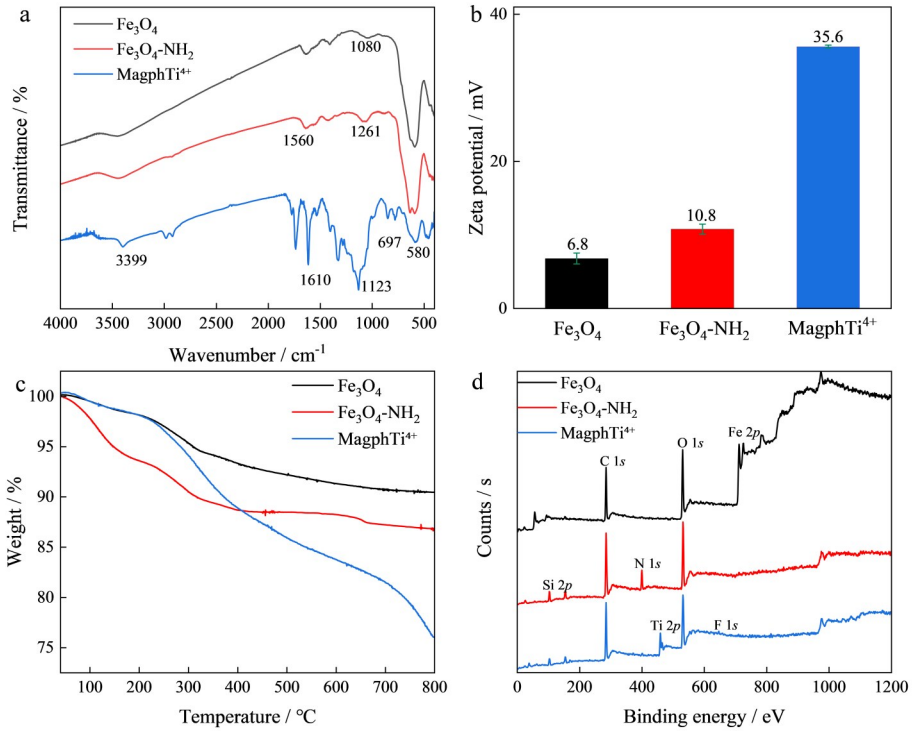


图 3　Fe_3O_4，Fe_3O_4-NH_2 和 $MagphTi^{4+}$ 的表征

Fig. 3　Characterization of Fe_3O_4, Fe_3O_4-NH_2 and $MagphTi^{4+}$

a. FTIR spectra; b. Zeta potentials; c. TGA curves; d. XPS curves.

2.2　$MagphTi^{4+}$ 富集磷肽的能力

以酶解后的 10 pmol/μL β-酪蛋白为标准样品，考察 $MagphTi^{4+}$ 对磷肽段的富集能力。在不同溶剂条件下，$MagphTi^{4+}$ 对目标肽段的吸附能力会发生变化。本研究通过控制单一变量法，分别考察不同的极性和酸度对缓冲溶液富集能力的影响。当缓冲溶液酸度为 1% TFA 时，优化不同体积分数（50% 和 70%）的 ACN；当 ACN 体积分数为 70% 时，优化缓冲溶液酸度条件（1% 和 0.1% TFA）。结果表明，对未经富集的 β-酪蛋白酶解液进行直接检测时几乎无法检测到磷肽的质谱峰（图 4a）。当缓冲溶液为 1% TFA 的 50% 乙腈水溶液时，质谱图中存在杂峰且磷肽的峰信噪比相对较低（图 4b）。缓冲溶液为含 1% TFA 的 70% 乙腈水溶液时，质谱图中几乎无杂峰且磷肽的峰信噪比相对较高（图 4c）。当缓冲溶液为含 0.1% TFA 的 70% 乙腈水溶液时，质谱图中磷肽的峰信噪比相对较低（图 4d）。因此，选取含 1% TFA 的 70% 乙腈水溶液作为后续富集实验中的缓冲溶液。

在以上得到的最佳实验条件下考察方法的灵敏度，将酶解后 β-酪蛋白溶液进行稀释（40、4 和 0.4 fmol/μL）。由图 5 可见，本方法可从 0.4 fmol/μL 的样品中检测到 3 条磷肽（m/z 2 062.9、2 556.2 和 3 124.4），且 S/N>3，对比于近年其他文献所报道的方法（表 1），本方法具有较高灵敏度，优于近年的大多数文献方法。

表 1　不同材料对磷肽富集后的分析结果

Table 1　Analysis results of phosphopeptides after enrichment by different materials

Material	LOD/（fmol/μL）	Selectivity（β-casein∶BSA, mass ratio）	Ref.
GO@PEI@CS@Ti^{4+}	5	1∶100	[38]
SPIOs@PVP-PEI@MOF@Arg	10	1∶1000	[39]
Fe_3O_4@GO@PEI@Ti^{4+}	2.5	1∶1000	[40]
Fe_3O_4@ILI-01@Ti^{4+}	0.5	1∶1000	[41]
Fe_3O_4@UiO-66-NH_2-Zr^{4+} HFs	1.0	1∶200	[42]
$MagphTi^{4+}$	0.4	1∶5000	this work

BSA: bovine serum albumin.

为考察该方法的选择性，将 β-酪蛋白与非磷蛋白 BSA 的混合酶解液按照 1∶5 000 的质量比混合作为混合样品。MALDI 质谱检测结果表明，对复杂样品进行直接检测时无法检测到磷肽的质谱峰（图 6a）；经 $MagphTi^{4+}$ 富集后，非磷肽的峰被显著抑制，

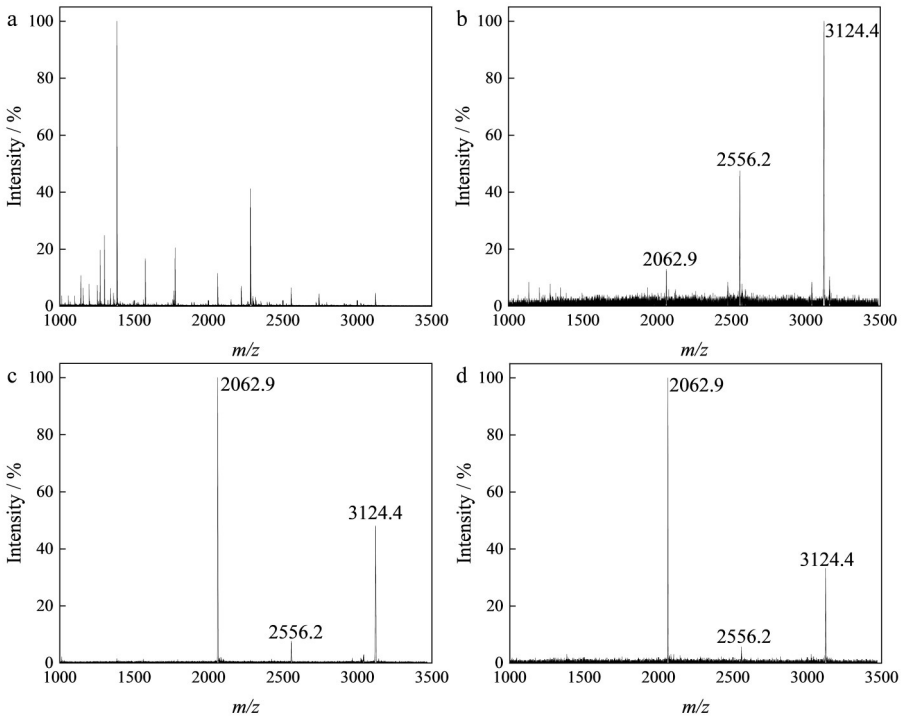


图 4　β-酪蛋白酶解液的 MALDI 质谱图

Fig. 4　MALDI mass spectra of β-casein digests

a. direct analysis; b–d. analysis after enrichment with different loading buffers: (b) 50%ACN+49%H_2O+1%TFA; (c) 70%ACN+29%H_2O+1%TFA; (d) 70%ACN+29.9%H_2O+0.1%TFA.

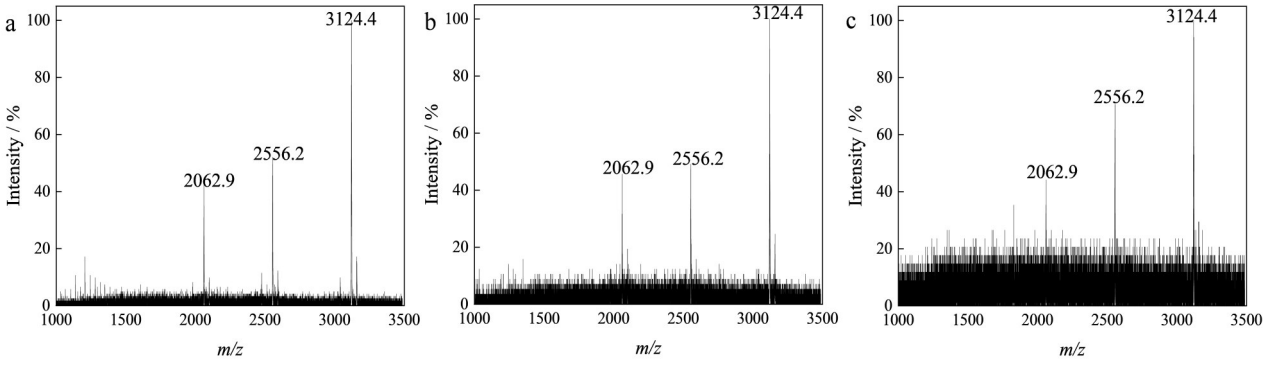


图 5　MagphTi^{4+}富集后 β-酪蛋白酶解液的 MALDI 质谱图

Fig. 5　MALDI mass spectra of β-casein digests after enrichment by MagphTi^{4+}

Concentrations of β-casein digests: a. 40 fmol/μL; b. 4 fmol/μL; c. 0.4 fmol/μL.

可观察到较强的磷肽信号峰(*m/z* 2 062.9、2 556.2、3 124.4)(图 6b)。最后,为考察 MagphTi^{4+}的可重复利用性,选用 10 pmol/μL β-酪蛋白酶解液作为标准品,在相同条件下,用 MagphTi^{4+}对 β-酪蛋白酶解液进行反复富集和洗脱,对第 1 次和第 6 次富集的结果进行分析,如图 6c 和 6d 所示,该材料在重复使用 6 次后所富集到的磷肽与第 1 次富集的结果几乎无差异,仍可高特异性富集磷肽。

2.3　实际样品分析

为了验证 MagphTi^{4+}在实际生物样品分析中对磷肽的富集能力,选择唾液和脱脂牛奶样品,在最优富集条件下对实际样品进行分析检测。如图 7a 所示,在未经富集的唾液样品中几乎检测不到磷肽。而经过 MagphTi^{4+}富集后,共检测到 11 条磷肽(图 7b),其中包括 4 条多磷肽和 7 条单磷肽,表 2 为检测到的磷肽的详细信息。如图 7c 所示,在未经富集的脱脂牛奶样品中,没有检测到磷肽的信号,这

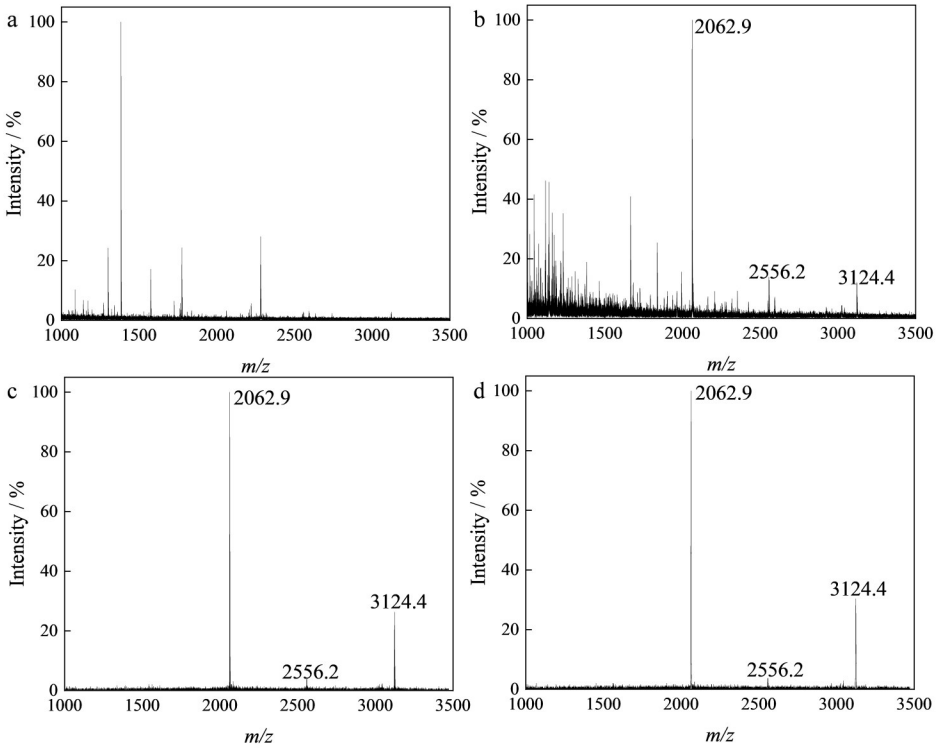


图 6　(a,b)混合样品和(c,d)β-酪蛋白酶解液的质谱图

Fig. 6　Mass spectra of (a, b) mixed samples and (c, d) β-casein digests

a. direct analysis; b. analysis after enrichment by MagphTi^{4+}; c and d. analysis after enrichment by MagphTi^{4+} for (c) the first time and (d) the sixth time.

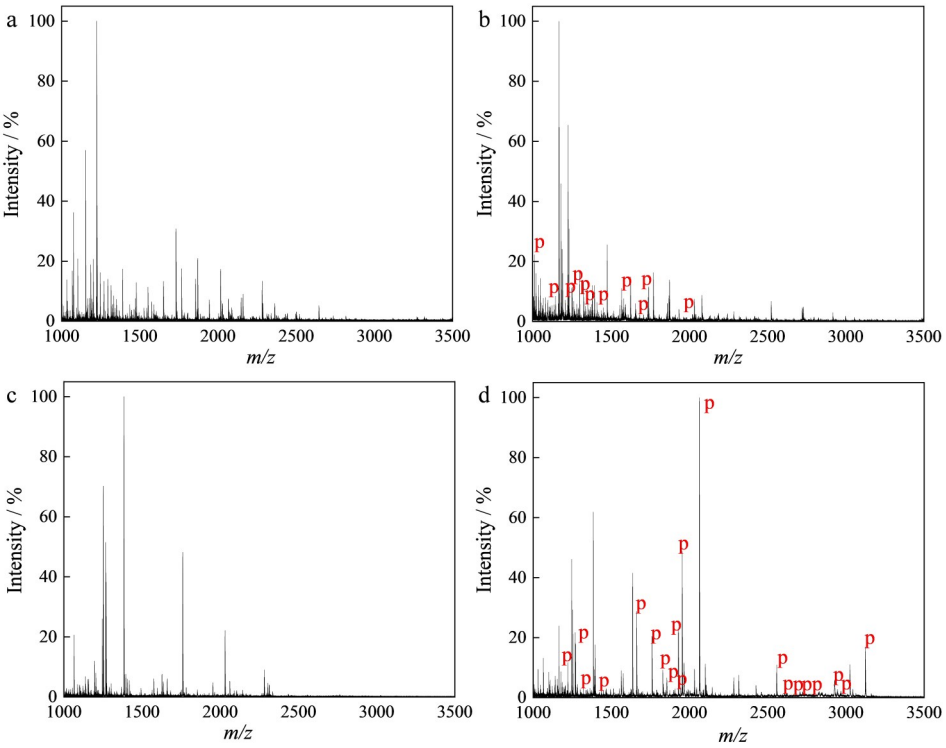


图 7　(a,b)唾液样品和(c,d)脱脂牛奶样品的质谱图

Fig. 7　Mass spectra of (a, b) saliva samples and (c, d) nonfat milk samples

a, c. direct analysis; b, d. analysis after enrichment by MagphTi^{4+}. p in Fig. (b) and (d) represents phosphopeptide.

是由牛奶样品中大量非磷肽的干扰造成的。相比较，经 MagphTi^{4+}富集后，在牛奶样品中检测到 20 条磷肽（图 7d），其中包括 9 条多磷肽和 11 条单磷肽，表 3 为检测到的磷肽的详细信息。以上结果说明所制备的 MagphTi^{4+}具备应用于实际样品分析的能力。

表 2 经 MagphTi^{4+}富集后唾液样品中的磷肽

Table 2 Phosphopeptides obtained from saliva samples after enrichment by MagphTi^{4+}

No.	*m/z*	Peptide sequence
1	998.06	ssEEKFL
2	1159.15	ssEEKFLR
3	1187.70	DsSEEKFLR
4	1231.64	SsEEKFLRR
5	1270.75	DssEEKFLR
6	1305.53	GPPPQGDKsRSP
7	1424.19	DssEEKFLRR
8	1589.70	GGDsEQFLDEERQ
9	1703.96	DGGDsEQFLDEERQ
10	1731.92	GPPAQGGsKSQSARAPPG
11	2003.99	VISDGGDsEQFIDEERQ

* All phosphopeptides obtained from each sample are numbered in ascending order of *m/z*.

表 3 经 MagphTi^{4+}富集后脱脂牛奶样品中的磷肽

Table 3 Phosphopeptides obtained from nonfat milk samples after enrichment by MagphTi^{4+}

No.	*m/z*	Peptide sequence
α1	1237.50	TVDMEsTEVF
α2	1267.92	YLGYLEQLLR
α3	1337.70	HIQKEDVsER
α4	1466.86	TVDMEsTEVFIK
α5	1660.79	VPQLEIVPNsAEER
α6	1759.75	HQGLPQEVLNENLLR
α7	1832.73	YLGEYLIVPNsAEER
α8	1847.82	DIGSEsTEDQAMEDIK
α9	1927.56	DIGsEsTEDQAMEDIK
α10	1943.79	DIGsEsTEDQAMoEDIK
α11	1952.68	YKVPQLEIVPNsAEER
α12	2619.25	NTMEHVsssEESIIsQETYK
α13	2678.23	VNELsKDIGsEsTEDQAMEDIK
α14	2704.06	QMEAEsIsssEEIVPNsVEA
α15	2720.89	QMEAEsIsssEEIVPNPNsVE
α16	2935.24	EKVNELsKDIGsEsTEDQAMEDI
β1	2062.14	FQsEEQQQTEDELQDK
β2	2556.46	FQsEEQQQTEDELQDKIHPF
β3	2965.98	ELEELNVPGEIVEsLsssEESI
β4	3122.68	RELEELNVPGEIVEsLsssEESI

α represents α-casein. β represents β-casein.

最后，将 MagphTi^{4+}用于结直肠癌患者血清外泌体的提取及外泌体磷肽的富集分析。如图 8a、8b 所示，由 SEM、TEM 表征可见，图中存在直径约 90

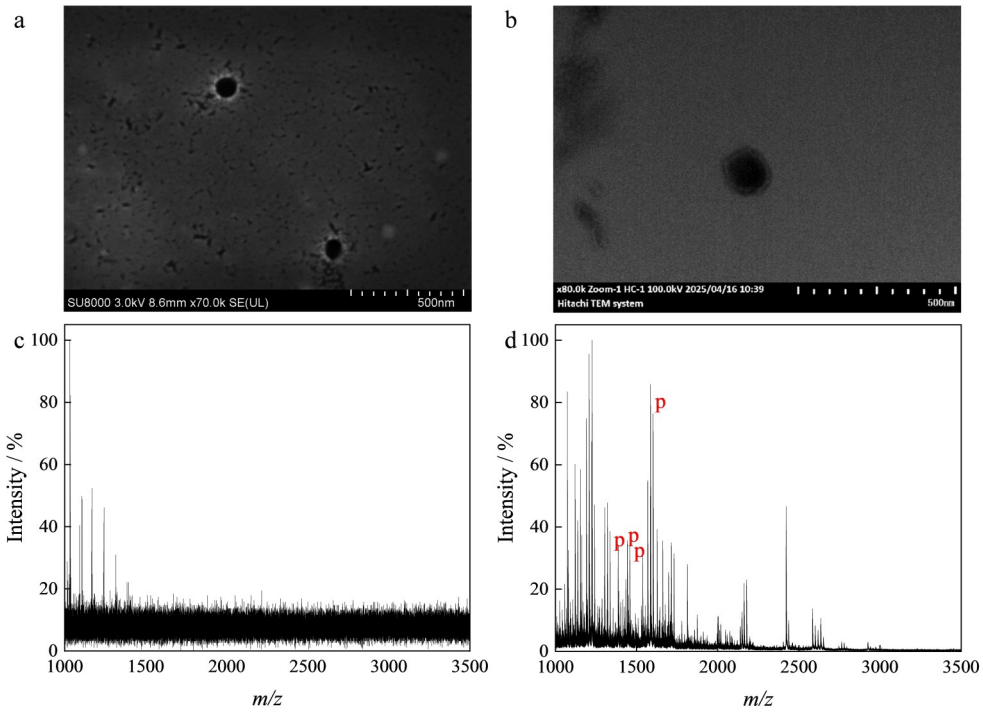


图 8 （a，b）对提取的外泌体的表征和（c，d）血清外泌体样品的质谱图

Fig. 8 （a，b）Characterization of isolated exosomes and（c，d）mass spectra of exosomes in serum samples

a. SEM images；b. TEM images；c. direct analysis；d. analysis after enrichment by MagphTi^{4+}.

nm 的囊泡为血清外泌体;如图 9 所示,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果表明提取的样品中存在血清外泌体的蛋白质标志物,结合电镜和电泳的表征可证明材料对外泌体的特异性提取[43],但对外泌体浓度的定量有一定的局限性。将所提取的外泌体进行裂解及酶解操作后,对比经 MagphTi^{4+}富集前后磷肽的质谱结果。如图 8c 所示,在未经 MagphTi^{4+}富集的质谱图中,由于血清外泌体样品中大量非磷肽及其他无机盐的干扰,磷肽的信号丰度极低,几乎观测不到。经 MagphTi^{4+}富集后,可以检测到 4 条磷肽,归属于血清中的纤维蛋白原(图 8d),富集到的磷肽的详细信息见表 4。综上,MagphTi^{4+}具有从复杂生物样品中精准识别和快速分离外泌体和富集外泌体磷肽的能力。

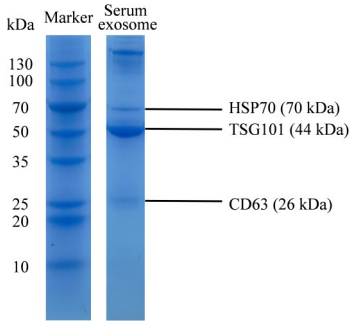


图 9　十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳结果(考马斯亮蓝染色)
Fig. 9　Results of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (stained with Coomassie blue)

表 4　经 MagphTi^{4+}富集后血清内外泌体中的磷肽
Table 4　Phosphopeptides obtained from exosomes in serum after enrichment by MagphTi^{4+}

No.	*m/z*	Peptide sequence
1	1389.92	DsGEGDFLAEGGGV
2	1460.01	ADsGEGDFLAEGGGV
3	1545.06	DsGEGDFLAEGGGVR
4	1616.11	ADsGEGDFLAEGGGVR

3　结论

本研究制备了一种 2-三氟甲基-4-氨基苯甲酸和 Ti^{4+}修饰的双功能磁性材料,能够对外泌体精准识别的同时实现对磷肽的高选择性分离富集。MagphTi^{4+}材料以高磁响应性的优势实现了外泌体的快速分离,以 Ti^{4+}与磷肽间的 IMAC 机理实现了对磷肽的高效富集。结合 MALDI-TOF MS 检测手段,可实现对血清中外泌体磷肽的特异性检测。该方法克服了外泌体中低丰度磷肽检测的技术瓶颈,在临床样品磷酸化蛋白质组学分析中具有较高的潜力,为筛选高特异性肿瘤标志物提供了新思路。利用本研究开发的方法进行进一步研究有望为解析外泌体介导的磷酸化信号跨细胞传递机制、揭示肿瘤转移与免疫逃逸新靶点带来新的理解。

参考文献:

[1] Liu W, Weng L X, Gao M X, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2024, 42(7): 601
刘威, 翁凌霄, 高明霞, 等. 色谱, 2024, 42(7): 601
[2] Zhao Y, Liu X, Zhang Y D, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(12): 1073
赵媛, 刘新, 张译丹, 等. 色谱, 2023, 41(12): 1073
[3] Anderson N L, Anderson N G. Mol Cell Proteomics, 2002, 1(11): 845
[4] Blennow K, Hampel H, Weiner M, et al. Nat Rev Neurol, 2010, 6(3): 131
[5] Tenzer S, Docter D, Kuharev J, et al. Nat Nanotechnol, 2013, 8(10): 772
[6] Hsu A Y, Huang Q, Pi X, et al. Cell, 2025, 188(6): 1623
[7] Kalluri R, McAndrews K M. Cell, 2023, 186(8): 1610
[8] Pefanis E, Wang J G, Rothschild G, et al. Cell, 2015, 161(4): 774
[9] Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, et al. Nat Med, 2012, 18(6): 883
[10] Shi M, Liu C, Cook T J, et al. Acta Neuropathol, 2014, 128(5): 639
[11] Kamerkar S, LeBleu V S, Sugimoto H, et al. Nature, 2017, 546(7659): 498
[12] Synowsky S A, van den Heuvel R H H, Mohammed S, et al. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(9): 1581
[13] Engeland K. Cell Death Differ, 2022, 29(5): 946
[14] Jiang W, Jaehnig E J, Liao Y X, et al. Nat Commun, 2025, 16(1): 2766
[15] Melo S A, Luecke L B, Kahlert C, et al. Nature, 2015, 523(7559): 177
[16] Kowal J, Arras G, Colombo M, et al. PNAS, 2016, 113(8): E968
[17] Shao H L, Im H, Castro C M. Chem Rev, 2018, 118(4): 1917
[18] Chen Y C, Zhu Q F, Cheng L M, et al. Nat Methods, 2021, 18(2): 212
[19] Boriachek K, Masud M K, Palma C, et al. Anal Chem, 2019, 91(6): 3827
[20] Wei D, Sun J, Luo Z J, et al. Anal Chem, 2024, 96(38): 15466
[21] Wei D, Sun J, Luo Z J, et al. Anal Chem, 2024, 96(3): 1223
[22] Chang W Y, Cai Y H, Sun J, et al. ACS Nano, 2025, 19(9): 9196
[23] Grishaev N A, Moiseeva E O, Chernyshev V S, et al. J Mater Chem B, 2024, 12(27): 6678
[24] Zheng S, Su N, Zhang R, et al. Anal Chem, 2025, 97(11): 6320
[25] Chen H, Ma M, Zhang L, et al. Microchim Acta, 2025, 192

(4): 259
[26] Wang B C, Xie Z H, Ding C F, et al. TrAC-Trends Anal Chem, 2023, 158: 116881
[27] Cheng Z, Misra S K, Shami A, et al. Anal Chem, 2022, 94(51): 18017
[28] Wu C, Zhang S, Hou C, et al. Anal Chem, 2024, 96(21): 8254
[29] Tang R Z, Bai Q, Ma S J, et al. TrAC-Trends Anal Chem, 2023, 158: 116862
[30] Chen C W, Tsai C F, Lin M H, et al. Anal Chem, 2023, 95(33): 12232
[31] Sun J, Li Q, Ding Y, et al. Angew Chem Int Ed, 2023, 62(29): e202305668
[32] Chu Z Y, Song Y M, Wu M G, et al. Anal Chem, 2024, 96(35): 14099
[33] Deng H, Li X L, Peng Q, et al. Angew Chem Int Ed, 2005, 44(18): 2782
[34] Serpa J D, Bizerra V D, Alexandre V S, et al. Langmuir, 2024, 40(51): 26835
[35] Zheng H, Jia J, Li Z, et al. Anal Chem, 2020, 92(3): 2680
[36] Zhao Y, Xu W, Zheng H, et al. Anal Chem, 2023, 95(23): 9043
[37] Xiong F F, Jia J X, Ma J T, et al. Nanoscale, 2022, 14(3): 853
[38] Ti W, Liu M, Xie A, et al. Talanta, 2025, 282: 126955
[39] Luo B, Yang M, Jiang P, et al. Nanoscale, 2018, 10(18): 8391
[40] Qi H, Li Z, Ma J, et al. J Mater Chem B, 2022, 10(18): 3560
[41] Xie P, Liu J, Liao Z, et al. Food Chem, 2025, 464: 141541
[42] Zhang N, Qin M J, Zhu J W, et al. Chin Chem Lett, 2025, 36(4): 110177
[43] Ishii N, Tateno H. Microsc Microanal. 2025, 31(1): 133