乳源外泌体的提取及鉴定方法研究进展

郝海宁, 仝令君, 张兰威, 易华西*

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003)

摘 要: 乳外泌体是乳中纳米级的胞外囊泡, 不仅能够作为药物载体, 而且具有促进肠道发育、免疫调节等功能, 在婴幼儿配方食品以及功能性食品开发方面具有极大的潜力。外泌体含量低是限制其广泛应用的瓶颈之一。目前, 外泌体提取及鉴定的方法尚没有统一的标准, 选择合适的乳外泌体提取、鉴定方法对后续的深入研究十分关键。据此, 本文综述了目前乳外泌体的提取及鉴定方法, 探讨了尚未应用于乳外泌体提取鉴定但理论可行的新方法, 期望为乳外泌体的研究与开发提供理论参考。

关键词: 乳外泌体; 提取; 鉴定; 开发

Advances in extraction and identification methods of milk-derived exosomes

HAO Hai-Ning, TONG Ling-Jun, ZHANG Lan-Wei, YI Hua-Xi*

(*Colledge of Food Science and Engineering*, *Ocean University of China*, *Qingdao* 266003, *China*)

ABSTRACT: Milk-derived exosomes are nano-scale extracellular vesicles in milk. They can not only be used as a drug carrier but also promote intestinal development and immune regulation. Milk-derived exosomes have great potential for use in infant formula and functional foods in the future. Low yield is one of the bottle neck for the development of milk-derived exosomes. At present, there is no uniform standard for methods for extraction and identification of exosomes, so it is very important to select appropriate methods for the extraction and identification of milk exosomes for subsequent studies. Based on the above research progress, this paper reviewed the current methods of extraction and identification of exosomes from milk, and discussed new methods those had not been applied to the extraction and identification of exosomes from milk. It is expected to provide a theoretical reference for the research and development of milk-derived exosomes.

KEY WORDS: milk-derived exosomes; extract; identification; development

1 引 言

外泌体是细胞外囊泡的一种, 其含有脂类、蛋白质、miRNAs 以及 mRNAs 等多种内容物。1983 年, 外泌体首次在成熟哺乳动物的网状细胞(未成熟的红细胞)中被发现[1]。随着研究的深入, 发现外泌体在细胞间信息交流[2,3]、免疫调节[4]方面有重要作用, 并应用于癌症治疗[5], 还作为药物载体及疾病诊断的生物标记[6]等。外泌体已经从血液、尿液、唾液、乳汁、羊水、腹水等不同的体液中分离得到[7]。

乳汁是哺乳动物重要的食物来源, 可以从哺乳动物中大量获取, 其安全性高、来源广泛, 生物成本较低[8,9]。随着对外泌体的深入研究, 发现外泌体及其 RNA 内容物不仅可以来源于内源性合成, 还可以从饮食来源获得, 例如牛乳外泌体及其RNA可以在人和牛两物种间的转移[10]。

基金项目: 国家重点研发项目(2018YFC1604305-3、2018YFC1604302)

Fund: Supported by the National Key R&D Program of China (2018YFC1604305-3, 2018YFC1604302)

*通讯作者: 易华西, 教授, 博士生导师, 研究方向为乳品生物技术。E-mail: yihx@ouc.edu.cn

***Corresponding author:** YI Hua-Xi, Professor, College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China. E-mail: yihx@ouc.edu.cn

因此, 人们开始对人、牛、猪等不同生物体的乳外泌体进行研究。乳中含有蛋白质、脂肪、乳糖、矿物质、维生素等多种物质, 尤其是乳中含有高含量的脂质, 脂质(主要是三酰甘油)通过乳房上皮细胞在乳中释放为脂肪球(milk fat globule, MFG), 这些 MFG 是蛋白质和糖蛋白的复合磷脂三层包围的脂质小滴, 因其存在一些与外泌体相似的性质及在乳中大量存在, 会使外泌体的分离变得复杂[11,12]。目前, 人们对于外泌体的提取还没有一个统一的标准, 各种提取方法均存在优缺点。

本文综述了用于及具有潜力可以用于乳外泌体的提取及其鉴定方法, 为今后乳外泌体的研究与开发奠定基础。

2　乳外泌体的提取方法

2.1　超速离心法

超速离心法是目前提取外泌体最常用、报道最多的方法, 被认为是外泌体提取的“黄金标准”[13]。超速离心法是根据样品中外泌体、蛋白质、细胞等物质沉降速度的差异, 通过不同的离心力和离心时间, 将其按上清液、沉淀进行分离。外泌体的分离效率不仅取决于离心力 g[14], 还与转子的类型、κ-因子以及溶液粘度[15]有关。相比于水平转子, 固定角转子有更短的沉降路径长度, 因此其能有更好的分离效果, 但是其存在的缺点是得到的外泌体不在底部沉积, 而是在管壁上存在, 易在管壁上发生移动, 因此得到的外泌体球状物较少。κ-因子可以衡量转子的成球效率, 通过估算特定转子(t-时间, 以小时为单位, κ-κ 因子, s-沉降系数)来估算外泌体沉降所需的时间, 可以对不同实验室采用的离心条件进行比较和标准化[16]。粘度也是外泌体研究中所需要一个重要的参数, 在使用超速离心法处理生物液体时, 需要提前考虑样品的粘度对沉降速率以及外泌体大小的影响[17]。

超速离心法因其操作容易, 需要较少的技术知识, 对于长时间开展外泌体研究而言, 仅需要超速离心机, 具有实验费用低, 不使用化学试剂等优点, 日益成为研究人员在外泌体研究中最受欢迎的选择。采用超速离心法提取乳外泌体的基本思路如下: 首先, 初步离心除去乳液中的脂肪球, 然后, 再次或多次进行离心后除去乳液中的酪蛋白以及细胞碎片, 也可通过 0.22 μm 滤器进一步对样品进行过滤, 去除凋亡小体和小囊泡的聚集体[18-20]。得到澄清的样品后在>100000 g 离心力下离心 1~2 h, 初步得到外泌体, 将其溶于 PBS 溶液中, 根据实验条件可选择再次或多次超速离心得到外泌体。Cheng 等[21,22]利用 SW41T 型号转子在 110000 g 离心 2 h 提取猪乳外泌体, 发现猪乳外泌体存在丰富的 miRNA, 并表明猪乳外泌体促进肠上皮细胞的增殖。Izumi 等[23]在 100000 g, 90 min 条件下进行超离心后, 用 PBS 超离清洗得到牛乳外泌体并通过后期实验表明, 牛乳外泌体中的 miRNA 和 mRNA 能够被人体的巨噬细胞摄取。

超速离心法虽然是目前提取外泌体的“黄金标准”, 但同时其也存在不足。经过前期的处理能够去除一些大的污染物, 但仍存在其他杂质, 从其内容物特性的角度来看, 特别是在蛋白质组学领域, 牛乳中蛋白质聚集体的共沉淀对于质谱分析应用以及外泌体定量的蛋白质测量, 需要额外的纯化步骤, 否则, 非外泌体蛋白会影响分析[6]。此外, 超速离心法相对耗时且在高速离心条件下可能对外泌体造成损伤, 对下游分析造成一定影响[14]。

2.2　密度梯度离心法

密度梯度离心法是一种特殊形式的超速离心法, 分为等密度梯度离心法和速率区带离心法。等密度梯度离心是基于在离心管中预先构建的密度梯度介质中的大小、质量和密度来实现的。从顶部到底部密度逐渐升高。将样品作为窄带分层到密度梯度介质中, 并进行长时间超速离心循环。在施加离心力时, 样品中包括外泌体在内的溶质作为单独的区域通过密度梯度介质移动, 每个区域以其特定的沉降速率, 从而形成溶质区域带。与等密度梯度离心不同, 等密度梯度离心法提取外泌体仅取决于它们与其他溶质的密度差异, 速率区带离心法是将样品作为区带加载在密度梯度介质, 其允许分离具有相似密度但大小不同的外泌体。此外, 因为包括外泌体在内的的溶质的密度大于梯度介质的密度, 所以速率区带离心的过程是动态的, 为了防止外泌体沉淀, 常在离心管底部加入高密度的垫片[13]。

目前常用的密度梯度介质有蔗糖、碘克沙醇等, 作为超速离心法的特殊形式, 密度梯度离心法可以除去不同密度的蛋白聚集体, 得到高纯度的乳外泌体, 但是其存在的缺陷是操作复杂, 耗时长。密度梯度法提取外泌体的前期基本思路与超速离心法基本一致, 但是在>100000 g 离心完成后, 需将初步得到的外泌体放入密度梯度介质中, 在 100000 g 左右离心力下离心进一步纯化, 外泌体密度在 1.13~1.19 g/mL[24], 吸取外泌体层, 将纯化得到的外泌体溶于 PBS 中。目前在针对乳外泌体蛋白质组学的研究中, 更倾向于使用蔗糖密度梯度法[25-29]。较为经典的方法是 Reinhardt[25]在 2012 年对牛乳外泌体蛋白质组学进行研究时的提取方法, 在超离初步得到外泌体后, 设置 80%、43%、35%、5% 4 个蔗糖密度梯度下离心 16 h 后, 在 43%/35%层得到纯化后的乳外泌体。

2.3　化学沉淀法

化学沉淀法又称聚合物沉淀法, 是在病毒研究中[30]延伸出的一种外泌体提取方法, 其原理是通过引入排水聚合物, 如聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)[31], 将水分子结合在一起, 改变溶解度或分散性, 使溶解性较低的组分从溶液中排出[32], 再通过低速离心, 获得外泌体沉淀物。

目前部分外泌体提取的商业化试剂盒采用化学沉淀法。化学沉淀法提取乳外泌体的基本思路是利用 2000~12000 *g* 离心除去乳中的脂肪球和细胞碎片，也可进一步利用 0.45、0.22 μm 滤膜过滤。将沉淀剂加入得到的上清液中，在 4 ℃条件下孵育过夜，通过离心得到外泌体沉淀。Qi 等[33]利用 ExoQuick 沉淀试剂盒提取母乳外泌体，并证明其含有丰富的免疫相关的 miRNA。Lukasik 等[34]利用沉淀试化学剂盒提取人和猪乳外泌体，并对其 miRNA 进行分析，表明哺乳动物乳外泌体中存在丰富的植物 miRNAs。Rani 等[35]利用同样的沉淀试剂盒从牛乳中提取外泌体，通过建立一种新的体外消化模型以及细胞实验表明，牛乳外泌体保护 miRNA 免受严重的消化过程，并且它们能够穿过肠屏障以达到血液循环、获得细胞功能。

化学沉淀法与超速离心法都属于非特异性分离外泌体的方法，因此其前处理及后纯化过程显得尤为重要。沉淀法提取外泌体所使用时间较短，且操作简单，但提取的外泌体纯度有待确定，因为沉淀过程中可能导致其他非外泌体污染物一起沉淀，例如蛋白质聚合物。因此需要更细致的前后分离步骤。在预分离步骤可去除亚细胞颗粒，如脂蛋白，后分离步骤可以选择使用 Sephadex G-25 柱去除聚合物。此外，利用化学沉淀法，除样品中存在的污染物，试剂中还含有与质谱分析不相容的聚合物 PEG，而 PEG 是蛋白质组学分析中最常见的干扰因子之一。它是离子源中的离子抑制剂，在质谱上观察到+44 离子系列[36,37]。作为非挥发性溶质，PEG 可防止基质结晶，但在基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析的过程中，容易污染液相柱[38,39]。在这种情况下，进行蛋白质组学研究时，可以选择凝胶内消化或其他方法来进行的样品制备，而不是直接进行质谱或液相色谱质谱分析[40,41]。

2.4 尺寸排阻法

尺寸排阻法又称凝胶层析过滤法，是一种根据外泌体大小利用色谱柱进行分离提取的方法。目前，利用尺寸排阻法提取乳外泌体多与超速离心法相结合，通过前期去除乳脂肪球、细胞碎片等物质，利用超高速离心得到外泌体，再利用色谱柱进行洗脱纯化[42-44]。Blans 等[42]利用尺寸排阻法成功从母乳和牛乳中分离出磷脂膜包被的胞外囊泡，并指出在不使用超速离心法的情况下单纯使用尺寸排阻法，其标记蛋白如 CD9、CD63、CD81 表达量更高。Vaswani 等[45]利用超速离心法结合尺寸排阻法、碘克沙醇密度梯度法提取牛乳外泌体，结果表明采用超离结合尺寸排阻法具有更高的乳外泌体产量。

尺寸排阻法的主要优点是操作简单、富集效率高、重现性好以及样品纯度较高。此外，尺寸排阻法是依靠重力的流动以及较低的压力分离外泌体，因此能够获得具有规则形状的非破裂外泌体。但是，色谱柱对样品上样量有限制，一般不超过 0.5 mL，一定程度上降低了外泌体的提取效率。另外，由于外泌体中蛋白质和脂质的严重污染，一般使用不超过 3 次就需要更换，这限制了此法在外泌体提取方面的应用[46]。

2.5 免疫捕获法

外泌体蛋白质组学研究表明，外泌体中既有普遍存在的共性蛋白质，也有细胞特异性的蛋白质，可作为外泌体免疫分离的标记物，据此开发出了外泌体的免疫捕捉法。外泌体的表面含有许多靶向标志物，比如来自四跨膜蛋白家族 CD63、CD9、CD81 或膜联蛋白[47]，可以与固定在各种载体上的特异性抗体高度选择性的结合，从而达到分离外泌体的目的。目前，免疫捕获法以各种试剂盒的形式广泛存在。常用的免疫捕获的试剂盒主要利用 ELISA 板、免疫磁珠等方法靶向表面标志物对外泌体进行标记。酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是利用纯化的抗体(如 CD9 抗体)包被微孔板，制成固相抗体与样本孵育提取外泌体。免疫磁珠法是利用 CD9、CD63 等抗体包被含对应抗原的磁珠与样本孵育，将样本中含有对应的蛋白的外泌体吸附并分离出来。与 ELISA 微孔板相比，磁珠的接触表面积大，获得的外泌体形态完整、均匀性较好[13,48]。

免疫捕获法操作简单，能够根据外泌体表面蛋白高特异性的选择外泌体，其纯度高，但是会忽略表面不含所选择靶向蛋白的外泌体，不适合大量样本的处理，且成本昂贵。此外，ELISA 法与免疫磁珠法提取过程中需要多次洗涤，易造成外泌体的流失。目前利用免疫捕获法提取外泌体的报道较少，考虑到乳样品成分的复杂性，对乳样品的前处理纯化提出了较高的要求，同时免疫捕获法不适用于大量样品的处理，必要时可以考虑将乳样品前处理后再进行浓缩，使其达到更好的效果。

2.6 微流控技术

微流控技术是分离外泌体的理想工具，能快速、经济、便携和精确地处理纳米粒子和小体积的液体样品。目前基于微流控技术进行外泌体的分离原理主要分为 3 类：基于尺寸的分离，基于免疫亲和的分离和动态分离。

基于尺寸的外泌体分离装置通常包含纳米过滤器，纳米多孔膜或纳米阵列，其通常放置在横截面中或制造在微流体通道的基底上。当样品流体流过通道时，外泌体会被束缚在这些结构中，从而达到分离效果[49]。基于免疫亲和的外泌体的分离方法原理与免疫捕获法分离外泌体的原理相似，通过用抗体修饰微通道表面或通过调整亲和颗粒或磁珠，利用免疫亲和力的微流体装置分离外泌体。根据外泌体表面的特定生物标志物，将含有靶蛋白的外泌体与其他胞外囊泡特异性分离[50]。考虑到基于大小和免疫亲和力的分离方法的局限和缺点，一些研究将电场、声力、流

体动力等外力的使用结合或整合到微流体设计中以更快、更容易地进行外泌体分离。这些方法可以归类为“动态”分离方法。

微流体方法与目前广泛使用的外泌体提取方法相比, 微流体分离技术更高效, 但是微流体技术仅适用于小体积样本外泌体的分离。基于尺寸的微流体方法虽然可以获得大小均匀的外泌体, 不受非外泌体蛋白和其他胞外囊泡的污染, 但其回收率低。基于免疫亲和的分离微流体方法实现了高外泌体纯度, 但只能分离出富含靶蛋白外泌体。动态分离法可以在分离后实现外泌体尺寸均匀性, 但设备操作对使用人员的技术及经验要求较高[51]。

3　乳外泌体的鉴定方法

目前, 多种光学和非光学方法已经被应用于外泌体数量、尺寸和表面特异蛋白的标记等特征的鉴定[52]。鉴定方法的优化和标准化仍然是一项重要任务。目前关于外泌体鉴定的方法主要有以下几种。

3.1　电镜鉴定法

电镜(electron microscope, EM)能够直观的观察外泌体结构、形态和粒径大小, 是宏观鉴定外泌体存在的直接证据。目前常用的电镜有扫描电镜、透射电镜、冷冻电镜, 其中以透射电镜为主。研究表明冷冻电镜技术可获得更好的成像效果[53]。利用透射电镜对外泌体进行鉴定的思路主要有两种。一种是直接染色法。将外泌体附着在铜网的碳面, 然后用磷钨酸、醋酸铀等染料对铜网(碳面浸液)上的外泌体进行染色, 干燥后再在电镜下观察。本实验室将外泌体浸润在铜网中 1 min, 利用滤纸去除多余的液体后, 再将铜网碳面放入磷钨酸中负染 1 min, 去除多余磷钨酸后在自然状态下干燥, 在透射电镜下清晰的观察到呈杯托状形态的外泌体。另一种方法是切片法。切片法需要先利用戊二醛、四氧化锇溶液对外泌体进行固定, 然后进行切片、染色观察。在胞外囊泡的研究中, 有报道称切片处理后能够观察到更多不易吸附在铜网上悬浮胞外囊泡, 在视野中能够获得更多的信息[12]。外泌体作为胞外囊泡的一种, 此方法也可应用于外泌体的鉴定。

3.2　免疫印迹法

免疫印迹法(western blot, WB)通过对外泌体上相关特异性蛋白进行标记, 确定外泌体的存在。该方法将乳外泌体与上样缓冲液混合煮沸变性(若外泌体溶液蛋白浓度过低, 可以选择利用氮气进行浓缩后, 再与上样缓冲液混合), 利用 5%/12%的胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 再通过半干/湿转的方式进行转膜, 洗脱后利用 5% BSA 进行封闭、一抗 4 ℃孵育过夜、二抗常温孵育, 最后显色成像, 从而达到特异性抗体标记测定。目前, 乳外泌体常用的标记蛋白为 TSG101、CD9、CD63、CD81、Alix 等[54,55]。本实验室利用 WB 技术对提取牛乳和母乳外泌体的 TSG101、CD9、CD81、Alix 进行标记, 结果表明 4 种蛋白均存在对应条带, 但牛乳外泌体中 Alix 的条带相对较浅, 具体结果还需通过质谱等方法对外泌体中蛋白进行更深入一步的定量确定。

3.3　动态光衍射法

动态光衍射法(dynamic light scattering, DLS)利用外泌体的布朗运动以及光散射理论, 结合后期的数学算法, 计算出单分散粒子的平均粒径大小, 从而反映出外泌体粒径大小分布情况。DLS 对于检测某一特定尺寸粒子时, 结果较为准确, 但在检测不同尺寸外泌体样品的尺寸分布时, 准确率降低。这主要是因为尺寸分布受到少量较大颗粒的影响, 大颗粒具有较高的折射率[56]。此外 DLS 测定的结果也会因分析软件的不同存在差异。

3.4　纳米粒子追踪分析法

纳米粒子追踪分析法(nanoparticle tracking analysis, NTA)是可以同时表征外泌体浓度和粒度分布的光学粒子追踪方法[57,58], 其原理是利用激光束被粒子散射, 通过 CCD 相机记录每个离子的平均速度, 再通过 Stokes-Einstein 方程计算颗粒的大小和浓度。NTA 技术因其样本处理简单、需要样品量少、能保证外泌体原始形态、检测速度快等优点被广泛应用于外泌体的表征。但在光散射模式下, 蛋白质聚集体不会与具有相似布朗运动的外泌体聚集体分开, 因此通过该技术测定的粒子浓度不能排除非外泌体的其他物质的干扰[12]。

3.5　流式细胞技术

流式细胞技术(flow cytometry, FCM)是细胞和小颗粒定性和定量表征的有效方法, 其用于外泌体定量检测的准确性不断提高。通过对外泌体表面特异性标志物如 CD63、CD81 等相应的抗体进行标记, 可以用流式细胞仪检测到阳性表达, 从而实现对外泌体的定量。流式细胞术检测比较快速, 适合高通量筛选, 且可分析颗粒的大小与体积。但是在使用流式细胞仪进行外泌体检测, 多个外泌体易被当作一个外泌体反应单个的信号, 使得检测浓度降低。此外, 由于外泌体的折射率较低, 限制了其自身量化技术的发展[59]。目前, 普通流式细胞术很难检测到直径在 100 nm 以下的外泌体, 但可以考虑加入纳米金颗粒增加外泌体的粒径提高检测效果[60]。新近开发的纳米级超高分辨率流式细胞仪已经能对分泌体进行量化与特异性分析。

3.6　酶联免疫法

酶联免疫法与 WB 技术原理一致, 利用抗体包被微孔板制成固相抗体, 向内加入待测样品, 封闭、一抗孵育, 洗涤后除去剩余抗体及其他成分, 再与酶标待测物质抗体结

合，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物；经过彻底洗涤后，加显色剂进行显色，用酶标仪测定吸光值，利用标准曲线计算外泌体的表达量[48]。相对于 WB 实验，酶联免疫法能够实现对外泌体特异性蛋白的定量。此外，利用原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)可以对外泌体的表面结构进行清晰的扫描观察；电阻式脉冲传感可以测定外泌体的浓度和大小。

4 展 望

基于目前报道的乳外泌体的分离提取方法及鉴定技术，还没有建立完善成熟的外泌体提取及鉴定标准，在乳外泌体的研究中需要注意以下几点：

(1) 乳的采集和储存条件会对乳成分有一定的影响。脂肪酸败、温度变化可能对乳外泌体有一定的影响，在研究过程中应尽量避免因环境因素造成的失误。

(2) 乳外泌体的提取方法上与其他来源的外泌体具有一定程度上的通用性，但是由于乳液成分的复杂性，在借鉴其他来源外泌体提取方法的同时，需要考虑前处理去除乳中较多的脂肪和蛋白杂质。

(3) 在鉴定方法上，由于各方法均存在一定的优缺点，目前尚不能根据单一方法对外泌体进行定性定量。在对外泌体进行鉴定时，建议两种以上方法相互辅证，以更好的对外泌体进行表征鉴定。

(4) 在乳外泌体以及其他来源外泌体的提取上，可考虑多种提取方法组合使用，以提高外泌体提取的效率和产率。

参考文献

[1] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, *et al*. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) [J]. J Biol Chem, 1987, 262(19): 9412–9420.

[2] Zempleni J. Milk exosomes: Beyond dietary microRNAs [J]. Genes Nutr, 2017, 12(1): 12.

[3] Nakamura A, Watanabe K, Ojima T, *et al*. Effect of maillard reaction on allergenicity of scallop tropomyosin [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(19): 7559–7564.

[4] 李瑞玮, 张娟娟, 欧阳红梅, 等. 外泌体在白血病免疫调节中的作用[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(8): 872–877.
Li RW, Zhang JJ, Ouyang HM, *et al*. Role of exosomes in immune regulation of leukemia [J]. Chin J Biol, 2017, 30(8): 872–877.

[5] Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: A comprehensive review [J]. Cancer Metast Rev, 2013, 32(3–4): 623–642.

[6] Abramowicz A, Widlak P, Pietrowska M. Proteomic analysis of exosomal cargo: The challenge of high purity vesicle isolation [J]. Mol Biosyst, 2016, 12(5): 1407–1419.

[7] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends [J]. J Cell Biol, 2013, 200(4): 373–383.

[8] Affolter M, Grass L, Vanrobaeys F, *et al*. Qualitative and quantitative profiling of the bovine milk fat globule membrane proteome [J]. J Proteom, 2010, 73(6): 1079–1088.

[9] 矫秋云, 宋宝华. 浅述人乳的功能及母乳喂养[J]. 中国乡村医药, 2002, 9(11): 23.
Jiao QY, Song BH. Talking about the function of human milk and breastfeeding [J]. Chin Rural Med, 2002, 9(11): 23.

[10] Sonia M, Bijaya U, Ezra M, *et al*. Milk exosomes are bioavailable and distinct microRNA cargos have unique tissue distribution patterns [J]. Sci Rep-UK, 2018, 8(1): 11321.

[11] Lopez C, Olivia M. Human milk fat globules: Polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane [J]. Coll Surf B Biointerf, 2011, 83(1): 29–41.

[12] Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, *et al*. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research [J]. J Extracell Vesicl, 2013, 2(1): 20360.

[13] Pin L, Melisa K, Han LS, *et al*. Progress in exosome isolation techniques [J]. Theranostics, 2017, 7(3): 789–804.

[14] Jeppesen DK, Hvam ML, Primdahl-Bengtson B, *et al*. Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation [J]. J Extracell Vesicl, 2014, 3(1): 25011.

[15] Izumi H, Tsuda M, Sato Y, *et al*. Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages [J]. J Dairy Sci, 2015, 98(5): 2920–2933.

[16] Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles [J]. J Extracell Vesicl, 2014, 3(1): 1–11.

[17] Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, *et al*. Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles [J]. Front Physiol, 2012, 3: 162.

[18] Savina A, Vidal M, Colombo MI. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11 [J]. J Cell Sci, 2002, 115(12): 2505–2515.

[19] Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes [J]. J Vis Exp, 2012, 59(59): 3037.

[20] Lobb RJ, Becker M, Wen SW, *et al*. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma [J]. J Extracell Vesicl, 2015, 4(1): 27031.

[21] Chen T, Xie MY, Sun JJ, *et al*. Porcine milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells [J]. Sci Rep-UK, 2016, 6: 33862.

[22] Chen T, Xi QY, Ye RS, *et al*. Exploration of microRNAs in porcine milk exosomes [J]. BMC Genom, 2014, 15(1): 100.

[23] Izumi H, Tsuda M, Sato Y, *et al*. Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages [J]. J Dairy Sci, 2015, 98(5): 2920–2933.

[24] Dommelen SMV, Vader P, Lakhal S, *et al*. Microvesicles and exosomes: Opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery [J]. J Control Rel, 2012, 161(2): 635–644.

[25] Reinhardt TA, Lippolis JD, Nonnecke BJ, *et al*. Bovine milk exosome proteome [J]. J Proteom, 2012, 75(5): 1486–1492.

[26] Van-Herwijnen MJC, Zonneveld MI, Goerdayal S, *et al*. Comprehensive proteomic analysis of human milk-derived extracellular vesicles unveils a novel functional proteome distinct from other milk components [J]. Mol Cell Proteom, 2016, 15(11): 3412–3423.

[27] Reinhardt TA, Sacco RE, Nonnecke BJ, *et al*. Bovine milk proteome: Quantitative changes in normal milk exosomes, milk fat globule membranes and whey proteomes resulting from Staphylococcus aureus mastitis [J]. J Proteom, 2013, 82(8): 141–154.

[28] Chen T, Xi QY, Sun JJ, *et al*. Revelation of mRNAs and proteins in porcine milk exosomes by transcriptomic and proteomic analysis [J]. Bmc Vet Res, 2017, 13(1): 101–114.

[29] Yang M, Song D, Cao X, *et al*. Comparative proteomic analysis of milk-derived exosomes in human and bovine colostrum and mature milk samples by iTRAQ-coupled LC-MS/MS [J]. Food Res Int, 2017, 92: 17–25.

[30] Leberman R. The isolation of plant viruses by means of "simple" coacervates [J]. Virology, 1966, 30(3): 341–347.

[31] Zeringer E, Barta T, Li M, *et al*. Strategies for isolation of exosomes [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2015, 2015(4): 319–323.

[32] Kim DK, Nishida H, An SY, *et al*. Chromatographically isolated $CD63^{+}CD81^{+}$ extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI [J]. P Natl Acad Sci USA, 2015, 113(1): 170–175.

[33] Qi Z, Li M, Wang X, *et al*. Immune-related micrornas are abundant in breast milk exosomes [J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(1): 118–123.

[34] Lukasik A, Zielenkiewicz P. In silico identification of plant miRNAs in mammalian breast milk exosomes-a small step forward [J]. PLoS One, 2014, 9(6): 99963.

[35] Rani P, Vashisht M, Golla N, *et al*. Milk miRNAs encapsulated in exosomes are stable to human digestion and permeable to intestinal barrier in vitro [J]. J Funct Foods, 2017, 34: 431–439.

[36] Keller BO, Sui J, Young AB, *et al*. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2008, 627(1): 71–81.

[37] Scheerlinck E, Dhaenens M, Soom AV, *et al*. Minimizing technical variation during sample preparation prior to label-free quantitative mass spectrometry [J]. Anal Biochem, 2015, 490: 14–19.

[38] Zhao C, Oconnor P. Removal of polyethylene glycols from protein samples using titanium dioxide [J]. Anal Biochem, 2007, 365(2): 283–285.

[39] Tholey A, Glückmann M, Seemann K, *et al*. Proteomics sample preparation [M]. Hagen: Wiley-VCH, 2008.

[40] Ramachandrarao SP, Matthias MA, Mondrogon CK, *et al*. Proteomic analysis of urine exosomes reveals renal tubule response to leptospiral colonization in experimentally infected rats [J]. PLoS Neglect Trop D, 2015, 9(3): 3640.

[41] Yang J, Lin M, Rau C, *et al*. Altered exosomal protein expression in the serum of NF-kappa B knockout mice following skeletal muscle ischemia-reperfusion injury [J]. J Biomed Sci, 2015, 22(1): 40.

[42] Blans K, Hansen M, Sorensen L, *et al*. Pellet-free isolation of human and bovine milk extracellular vesicles by size-exclusion chromatography [J]. J Extracell Vesicl, 2017, 6(1): 1294340.

[43] An MR, Wu J, Zhu JH, *et al*. Comparison of an optimized ultracentrifugation method versus size-exclusion chromatography for isolation of exosomes from Human serum [J]. J Proteom Res, 2018, 17: 3599–3605.

[44] Sedykh SE, Purvinish LV, Monogarov AS, *et al*. Purified horse milk exosomes contain an unpredictable small number of major proteins [J]. Biochim Open, 2017, 4(C): 61–72.

[45] Vaswani K, Koh YQ, Almughlliq FB, *et al*. A method for the isolation and enrichment of purified bovine milk exosomes [J]. Reprod Biol, 2017, 17(4): 341–348.

[46] 龚春梅, 徐远飞, 周继昌. 外泌体分离与鉴定方法的研究进展[J]. 生命科学, 2018, 30(3): 319–326.
Gong CM, Xu YF, Zhou JC. Advances in exosome isolation and identification methods [J]. Life Sci, 2018, 30(3): 319–326.

[47] Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA [J]. Proteomics, 2010, 9(21): 4997–5000.

[48] 贺娇, 许泼实. 外泌体提取方法及鉴定分析研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(7): 718–721.
He J, Xu PS. Advances in exosome extraction and identification [J]. Chin J Pract Diagnos Treat, 2018, 32(7): 718–721.

[49] He M, Zeng Y. Microfluidic exosome analysis toward liquid biopsy for cancer [J]. J Lab Autom, 2016, 21(4): 599–608.

[50] He M, Crow J, Roth M, *et al*. Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology [J]. Lab Chip, 2014, 14(19): 3773–3780.

[51] Yang F, Liao X, Tian Y, *et al*. Exosome separation using microfluidic systems: Size-based, immunoaffinity-based and dynamic methodologies [J]. Biotechnol J, 2017, 12(4): 1600699.

[52] Van-Der-Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, *et al*. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes [J]. J Thromb Haemost, 2010, 8(12): 2596–2607.

[53] Lee Y, El-Andaloussi S, Wood MJA. Exosomes and microvesicles: Extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy [J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(1): 125–134.

[54] Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, *et al*. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery [J]. Cancer Lett, 2016, 371(1): 48–61.

[55] Sun J, Aswath K, Schroeder SG, *et al*. MicroRNA expression profiles of bovine milk exosomes in response to Staphylococcus aureus infection [J]. Bmc Genom, 2015, 16(1): 806–815.

[56] Hoo CM, Starostin N, West P, *et al*. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions [J]. J Nanopart Res, 2008, 10(1): 89–96.

[57] Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, *et al*. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using nanoparticle tracking analysis [J]. Nanomedicine, 2011,

7(6): 780–788.

[58] Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (nta) by nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates [J]. Pharm Res-Dordr, 2010, 27(5): 796–810.

[59] Rafal S, Monika BK, Jakub Z, *et al*. The methods of choice for extracellular vesicles (evs) characterization [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(6): 1153.

[60] 肖漓, 白剑, 陈文, 等. 脐带间充质干细胞外泌体的分离和鉴定[J]. 中华细胞与干细胞杂志, 2016, 6(4): 236–239.
Xiao L, Bai J, Chen W, *et al*. Isolation and identification of exosomes from umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. Chin J Cell Stem Cell, 2016, 6(4): 236–239.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

郝海宁, 硕士研究生, 主要研究方向为乳品生物技术。
E-mail: haohaining1994@163.com

易华西, 教授, 博士研究生, 主要研究方向为乳品生物技术。
E-mail: yihx@ouc.edu.cn

“携手国际名企雀巢　护航食品安全”专题征稿函

《食品安全质量检测学报》是国内外公开发行的学术期刊, 是全国首本专注于食品安全与质量领域研究与开发的学术期刊, 主编为**国家食品安全风险评估中心技术总师吴永宁研究员**。现已被中国科技核心期刊、美国 EBSCO、英国《食品科学技术文摘》(FSTA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、《中国学术期刊网络出版总库》(CNKI)、“万方数据-数字化期刊群”等国内外知名数据库收录。

雀巢是世界知名的食品饮料公司, 拥有从全球知名品牌, 到各地受欢迎的本土产品, 业务遍布全球一百多个国家和地区, 丰富多样的产品, 为人生各个阶段带来健康选择。而食品安全是人民生活的保障, 也是雀巢各项工作的重中之重。

鉴于此, 编辑部特别携手雀巢公司联合策划出版 2 期食品安全专栏, 分别于 2019 年和 2020 年发表, 为食品安全的进一步健康发展提供技术与理论支持。

本次活动以“携手国际名企雀巢　护航食品安全”为专题题目, 该专题分为: ①食品掺假与危害物鉴定技术; ②国内外检测方法标准、法律法规的对比, 2 个栏目, 对全国相关科研单位以及高校进行约稿, **特邀雀巢食品安全研究院(中国)院长 鲍蕾 研究员 担任专题主编**。每期栏目收稿 10 篇。

栏目 1 食品掺假与危害物鉴定技术, 2019 年 8 月 15 日截稿, 11 月份出版;

栏目 2 国内外检测方法标准、法律法规的对比, 2020 年 8 月 15 日截稿, 11 月份出版。

本刊主编 **国家食品安全风险评估中心 吴永宁 研究员** 及专题主编 **鲍蕾 研究员** 特邀请您为本专题撰写稿件特别邀请您为本专题撰写稿件, 感谢您的支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(选择**携手国际名企雀巢　护航食品安全**专题)

E-mail: jfoodsq@126.com(注明**携手国际名企雀巢　护航食品安全**专题文章)

《食品安全质量检测学报》编辑部