

# 现有溶酶体分离纯化技术的对比、分析和应用

毕骏东<sup>1,2</sup> 郑玲玲<sup>1,2</sup> 杨玫<sup>1,2\*</sup> 王永华<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>云南大学生命科学研究中心, 昆明 650504; <sup>2</sup>云南大学生命科学学院, 昆明 650504)

**摘要** 溶酶体作为真核细胞中重要的细胞器, 不仅是降解内外源物质的场所, 也是细胞能量感知和调节的中心, 能够协调细胞物质的转运、代谢和分泌。溶酶体稳态失衡会导致许多疾病, 如溶酶体贮积症、肿瘤、免疫缺陷和神经退行性疾病。获得完整、高纯度的溶酶体是研究其微观结构、稳态调控和相关分子功能的重要前提。目前常用的溶酶体分离纯化技术包括离心分离纯化、荧光辅助细胞器分选、亲和免疫分离纯化、磁性纳米颗粒分离纯化和 Lyso-IP 等。该文综述现有溶酶体分离纯化技术的原理、特点和应用, 并对它们进行对比分析。

**关键词** 溶酶体; 离心分离纯化; 荧光辅助细胞器分选; 亲和免疫分离纯化; 磁性纳米颗粒分离纯化; Lyso-IP

## Comparison, Analysis and Application of the Existing Lysosomal Isolation and Purification Methods

BI Jundong<sup>1,2</sup>, ZHENG Lingling<sup>1,2</sup>, YANG Mei<sup>1,2\*</sup>, WANG Yonghua<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Center for Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650504, China; <sup>2</sup>School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650504, China)

**Abstract** Lysosomes, as important organelles in eukaryotic cells, are not only the site of degradation of endogenous and exogenous substances, but also the center of cellular energy sensing and regulation, and are capable of coordinating the transport, metabolism and secretion of cellular substances. An imbalance in lysosomal homeostasis can lead to many diseases, such as lysosomal storage disorders, tumors, immunodeficiency and neurodegenerative diseases. Obtaining complete and highly pure lysosomes is an important prerequisite for the study of their microstructure, homeostatic regulation and related molecular functions. Currently, commonly used lysosomal isolation and purification techniques include centrifugal isolation and purification, fluorescence-assisted organelle sorting, affinity immunopurification, magnetic nanoparticle isolation and purification, and Lyso-IP. This article reviews the principles, characteristics and applications of the existing lysosomal purification techniques, and makes a comparative analysis of them.

**Keywords** lysosomes; centrifugal isolation and purification; fluorescence-assisted organelle sorting; affinity immunopurification; magnetic nanoparticle isolation and purification; Lyso-IP

溶酶体(lysosome)是真核细胞中高度动态的一种单层膜结构<sup>[1]</sup>, 膜上包含了离子通道蛋白、氨基酸转运蛋白和核苷酸转运蛋白等膜蛋白<sup>[2]</sup>。溶酶体内部pH值为4.5, 由V-ATPase维持, 溶酶体腔内存在蛋白酶、脂肪酶和核苷酸酶等多种酸性水解酶<sup>[3]</sup>, 因此,

溶酶体是细胞内降解途径的关键部分。溶酶体是由单层膜包裹的囊泡, 直径为0.025~0.800 μm<sup>[4]</sup>, 相比于内质网及其包被的腔所形成的扁囊状、管状三维结构<sup>[5]</sup>, 溶酶体呈现囊泡状, 与由扁平囊泡堆叠形成的高尔基体不同的是其异质性。现代生命科学的发展离

收稿日期: 2023-04-05

接受日期: 2023-07-10

云南省科技计划(批准号: K264202210012)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18088493023, E-mail: meiyang@ynu.edu.cn; Tel: 18083843023, E-mail: yonghuaw8002@ynu.edu.cn

Received: April 5, 2023

Accepted: July 10, 2023

This work was supported by the Science and Technology Plan of Yunnan Province (Grant No.K264202210012)

\*Corresponding authors. Tel: +86-18088493023, E-mail: meiyang@ynu.edu.cn; Tel: +86-18083843023, E-mail: yonghuaw8002@ynu.edu.cn

不开对各种细胞器功能及相关蛋白的研究, 如何高效快速地分离纯化溶酶体, 在富集目的组分的同时降低杂质污染<sup>[6]</sup>, 对于后续溶酶体组学分析、信号通路揭示、分子机制解析等起着重要作用。本文主要介绍现有的溶酶体分离纯化技术, 并对这些方法的原理、特点及应用进行对比分析。

## 1 溶酶体功能的重要性

溶酶体不仅是降解内外源物质的场所, 也是细胞能量感知和调节的中心<sup>[7]</sup>, 越来越多的研究表明溶酶体在细胞稳态中扮演着重要角色。溶酶体的形成受控于转录因子EB(transcription factor EB, TFEB), TFEB核质穿梭介导的溶酶体生物发生由多种信号通路进行调控。在正常情况下, 雷帕霉素靶蛋白(mechanistic target of rapamycin, mTOR)、糖原合成酶激酶3 $\beta$ (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ )、细胞外调节蛋白激酶2(extracellular regulated protein kinase 2, ERK2)、蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)和蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)等激酶会磷酸化TFEB上的特定位点, 使其滞留在细胞质中<sup>[8]</sup>; 在营养缺乏、氧化应激和炎症反应等情况下蛋白质磷酸酶2A(protein phosphatase 2A)或钙调磷酸酶(calcineurin)使TFEB去磷酸化, 并易位至细胞核中激活溶酶体生成<sup>[9]</sup>。溶酶体可将细胞外物质通过内吞和吞噬作用向胞内进行传递, 并将细胞内底物通过自噬作用进行循环降解<sup>[10]</sup>。内吞-溶酶体途径(endocytosis-lysosome pathway, ELP)涉及早期内吞体(early endosome)和晚期内吞体(late endosome)的形成, 晚期内吞体与溶酶体融合<sup>[11]</sup>, 溶酶体通过这种机制从外界环境中吸收物质分子, 使其进一步分解以供细胞循环代谢<sup>[12]</sup>。在吞噬-溶酶体途径(phagocytic-lysosome pathway, PLP)中, 胞外成分与细胞质膜相应受体结合后经吞噬作用进入细胞, 导致吞噬体(phagosome)的形成, 最终吞噬体与溶酶体融合形成吞噬溶酶体, 吞噬溶酶体行使降解功能<sup>[13]</sup>, 吞噬作用是一种特殊形式的细胞内吞作用, 可将微生物等病原体和外来的、衰老的细胞从体内清除<sup>[14]</sup>。自噬-溶酶体途径(autophagy-lysosome pathway, ALP)是一种溶酶体依赖的分解代谢过程, 起始于自噬泡的形成, 其中UNC-51样激酶1(UNC-51-like kinase 1, ULK1)、自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin1)、mTOR等组分与自噬起始密不可分<sup>[17]</sup>, 随后自噬泡在微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)等复合物的帮助下进行延

伸与识别<sup>[15]</sup>, 形成自噬体, 最终自噬体与溶酶体融合, 形成自噬溶酶体<sup>[16]</sup>。ALP可清除异常聚集的蛋白质和受损的细胞器等细胞组分<sup>[17]</sup>, 在个体发育过程中与细胞凋亡发挥着相似的作用, 保证个体的正常生长<sup>[18]</sup>。ALP障碍会导致胞内组分无法正常利用和降解<sup>[19]</sup>。

溶酶体的生物发生、物质运输、酸性环境及其参与的生物学事件对于多种疾病的机制挖掘与治疗具有重要作用, 溶酶体的稳态失衡和功能缺陷可诱发多种疾病如溶酶体贮积症(lysosomal storage disease, LSD)、肿瘤、免疫缺陷、神经退行性疾病等。LSD是溶酶体储存障碍的表现, 溶酶体蛋白或参与溶酶体功能的非溶酶体蛋白的编码基因发生突变, 会导致溶酶体介导的降解与循环过程障碍, 使底物以未降解的形式在溶酶体内积累<sup>[20]</sup>, 影响细胞内稳态。在黏脂沉积症IV型(mucopolipidosis IV, MLIV)中发现了瞬时受体电位黏蛋白1(transient receptor potential mucopolipin 1, TRPML1)发生基团突变, 且与该溶酶体膜蛋白相关联的细胞内运输出现障碍<sup>[21]</sup>; C1型尼曼-匹克病(Niemann-Pick disease C1, NPD-C1), 由溶酶体转运蛋白NPC1(NPC intracellular cholesterol transporter 1)突变引起, 该突变进而导致胆固醇在溶酶体中异常积累<sup>[22]</sup>。在肿瘤相关的研究中, ALP的降解循环可参与胰腺癌、肺癌和黑色素瘤的多种病理生理过程<sup>[23]</sup>, 同时, 自噬通量的变化可作为癌细胞能量代谢的特征; 并且这与TFEB相关的家族成员过度表达及雷帕霉素靶蛋白复合物1(mechanistic target of rapamycin complex 1, mTORC1)介导的生物合成途径过度激活有关联<sup>[24]</sup>。神经退行性疾病会表现出神经元结构和功能的退化与丧失, 神经胶质细胞的稳态也会被打破。溶酶体结构和功能异常影响着帕金森病(Parkinson's disease, PD)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)等神经退行性疾病的发生和发展<sup>[25]</sup>, ALP的缺陷会导致神经退行性疾病中的病理性蛋白集聚和神经元损伤<sup>[26]</sup>。

## 2 现有溶酶体分离纯化技术手段

随着分子细胞生物学、细胞器成像、动态示踪观测等多学科研究方法与组学技术的不断发展, 对于细胞器的研究也逐渐深入<sup>[27]</sup>。如何获得完整、高纯的溶酶体是研究溶酶体微观结构组成、稳态调控、相关生物分子定位的重要基础, 溶酶体分离纯化技

术的改进与应用是生物技术的创新趋势之一。常用的现有溶酶体分离纯化技术手段有离心分离纯化、荧光辅助细胞器分选、亲和免疫分离纯化、磁性纳米颗粒分离纯化、Lyso-IP等,这些方法的基本原理、优点及缺点见表1。

## 2.1 离心分离纯化

离心技术是实验室常用的一种分离手段,基于离心转子旋转产生的离心力与离心场作用于实验材料可达到分离亚细胞结构的效果。离心分离纯化是根据不同细胞器的密度、大小、沉降系数,逐级增加离心速度,使沉降系数不同的组分在不同的分离速度及时间下进行分批分离<sup>[28]</sup>,该方法可分为差速离心和密

度梯度离心。

在差速离心中,研究人员通常首先对细胞进行机械裂解,以释放其内容物,随着离心力和时间的增加,大颗粒组分会先沉淀,而小颗粒组分后沉淀。通过多次离心,可将不同组分根据大小进行分离。最终,研究人员可通过重悬沉淀的方式来获取溶酶体组分。这种物理手段可以将不同组分分批次进行离心收集,但仅以离心力与离心时间的组合并不能区分形状大小和密度的微小差异,且不能保证目的组分的均一。

密度梯度离心是在差速离心的基础上配置一定浓度的梯度介质,如氯化铯(CsCl)、多聚蔗糖(Ficoll)和胶体硅(Percoll)等,梯度介质应具有足够大的溶解度,

表1 现有溶酶体分离纯化技术对比分析

Table 1 Comparative analysis of existing lysosomal isolation and purification techniques

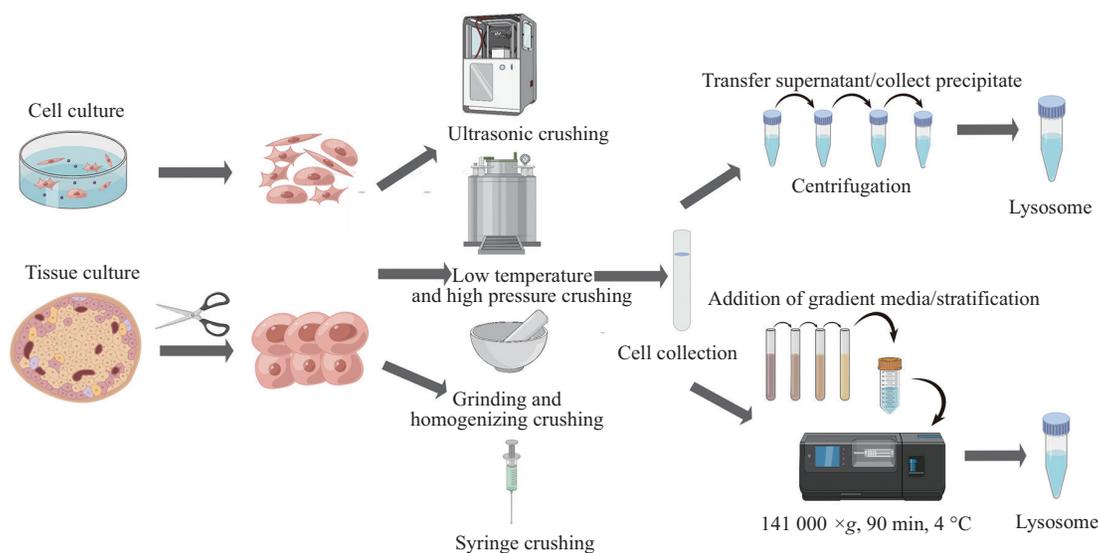
技术手段 Technology	基本原理 Basic principles	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
Centrifugal separation and purification	Batch separation based on density, size, and sedimentation coefficient of different organelles	Widely used in the separation of various subcellular structures, able to achieve the effect of batch processing, low-cost results	Require high-speed or ultra-speed centrifuges, collects fractions of low purity, easily destroys lysosomal integrity, time-consuming and labor-intensive
Fluorescence-assisted organelle sorting	Fluorescently labeled organelles flow through a high-speed flow system, flow through the detection zone for measurement, are irradiated by a laser beam to produce fluorescence and scattered light for discrimination, and are deflected by an electric field into different collection tubes	Accurate and rapid sorting of lysosomes preserves organelle viability and can be performed under sterile conditions	The organelles need to overcome the shear force of the liquid flow, prone to organelle fragmentation leading to lower yield, expensive instrumentation, need to explore fluorescently labeled proteins targeting lysosomes
Affinity immunopurification	Construction of cell lines stably expressing specific organelle marker proteins, binding of antibodies recognizing antigens to solid carriers, and elution to obtain target organelles	Applicable to a wide range of cell types and growth conditions, highly maneuverable, efficient, complete and pure lysosomes obtained	Need for specific design and preparation of antibodies, which requires consideration of the affinity of the antibody, elution efficiency of the eluent, and selection of the solid carrier
Magnetic nanoparticle isolation and purification	Magnetic nanoparticles are mixed and incubated with cells, enter the cell via the endocytosis pathway, localize on lysosomes, and drive the bound lysosomes to be deflected and sorted under the action of a magnetic field	Maintain lysosomal integrity and is able to meet the high purity and quantitative requirements of histological analysis and downstream characterization	It is not guaranteed that the normal physiological activities of cells will not be affected, the preparation of magnetic nanoparticles is time-consuming and labor-intensive, and there is uncertainty in its process factors
Lyso-IP	It includes three essential steps: constructing cell lines expressing fusion proteins, fusing tagged proteins with lysosomal markers, and specifically sorting lysosomal fractions using immobilized antibodies on solid supports, which selectively bind to lysosomes and facilitate their separation from other cell components through techniques like magnetic separation or centrifugation, ultimately resulting in the efficient enrichment of lysosomal fractions for comprehensive analysis and research	Fast and accurate, able to achieve high purity for histological analysis, able to ensure that small molecule metabolites are retained during the separation process	High purity cannot be guaranteed with high throughput, process factors for solid carriers need to be considered, and conditions need to be optimized for different cell lines and culture conditions

以形成所需的密度浓度范围,且梯度介质不会与样品中的组分发生凝集,从而防止组分的变性和失活<sup>[29]</sup>。然后将梯度介质加入到细胞溶液中,在选定的离心力作用下,不同密度的亚细胞结构在离心介质中向下沉降或向上漂浮,移动至与其密度相等的位置,即等密度点时,形成静止区带,达到离心平衡。各组分按密度不同处于区带的不同位置,将不同位置的组分分开收集可达到使其彼此分离的离心目的。离心分离纯化的基本过程如图1所示(所有过程图均由Figdraw绘制)。

离心分离纯化的技术手段广泛用于各种亚细胞结构的分离,要求实验室具有昂贵的高速或超速离心机,能够达到分批处理。但是由于不同细胞器、非细胞器物质的物理化学特性存在着相似性<sup>[30]</sup>,所收集的溶酶体组分仍会出现线粒体、过氧化物酶体等污染,这会影响到后续溶酶体转录组、蛋白质组的测定。由于溶酶体的异质性,收集的目的溶酶体组分纯度不高,甚至会有其他组分出现,导致损失过多<sup>[31]</sup>。强度大的离心力会破坏溶酶体的完整性,使部分溶酶体酶失去生物活性<sup>[32]</sup>,提取过程一般耗时耗力。

如何根据待分离组分确定最优的梯度介质是离心分离技术发展和现有技术改进的一个方向,仍需

不同试验组合不同梯度介质、离心力、离心时间来摸索出最佳试验方案以达到所需的纯度或者生物活性。理想的梯度介质应维持目的组分密度的稳定性,Percoll、Ficoll和Metrizamide等能够形成稳定的连续梯度或不连续梯度,不易影响分离材料的后续分析,在实验室中较为常用。最佳的梯度如何选择需根据所选的梯度介质及不同类型的细胞系或组织来进行确定,以达到易区分和收集各组分的效果。不同梯度所得组分的检测,通常使用蛋白免疫印迹定量检测组分中LAMP1、LAMP2、组织蛋白酶D等溶酶体标志蛋白,来显示溶酶体的富集程度,并且通过对 $\beta$ -己糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖脑苷酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶等溶酶体酶进行酶活测定,来判断溶酶体的活性和完整性。Percoll/Sucrose是常用的梯度液组合,其制备步骤简洁、材料易得、性质稳定,并且能够保持组分渗透压不易发生改变,但需要对不同密度梯度区间的组分进行相关溶酶体标志蛋白检测及酶活性测定,以确定溶酶体富集的组分,并且相似密度细胞器如线粒体等的污染难以避免。使用如以Nycodenz和Metrizamide为代表的介质形成密度梯度,能够最大程度降低生物颗粒的脱水程度,并可选用溶解在0.25 mol/L Sucrose中的5%、17%、



在离心分离纯化过程中,首先将细胞或组织收集起来,通过注射器、匀浆器、超声等方法破碎,使其释放内容物,收集胞内组分后进行离心。在差速离心过程中,通过转移上清和收集沉淀进行逐级离心;在密度梯度离心过程中,各组分按密度不同处于密度区带的不同位置,将不同位置的组分分开收集。最后通过重悬沉淀得到溶酶体组分。

In the process of centrifugation purification, cells or tissues are initially collected and then disrupted using methods such as a syringe, homogenizer, or ultrasound to release their contents. Subsequently, intracellular components are collected and separated through centrifugation. During the differential centrifugation, lysosomal fractions are obtained by transferring the supernatant and collecting the precipitate. In density gradient centrifugation, fractions are separated from each other based on their densities, as they are positioned in different density bands. Finally, the lysosomal fractions are resuspended and precipitated again to complete the purification process.

图1 离心分离纯化过程图(根据参考文献[28-29]修改)

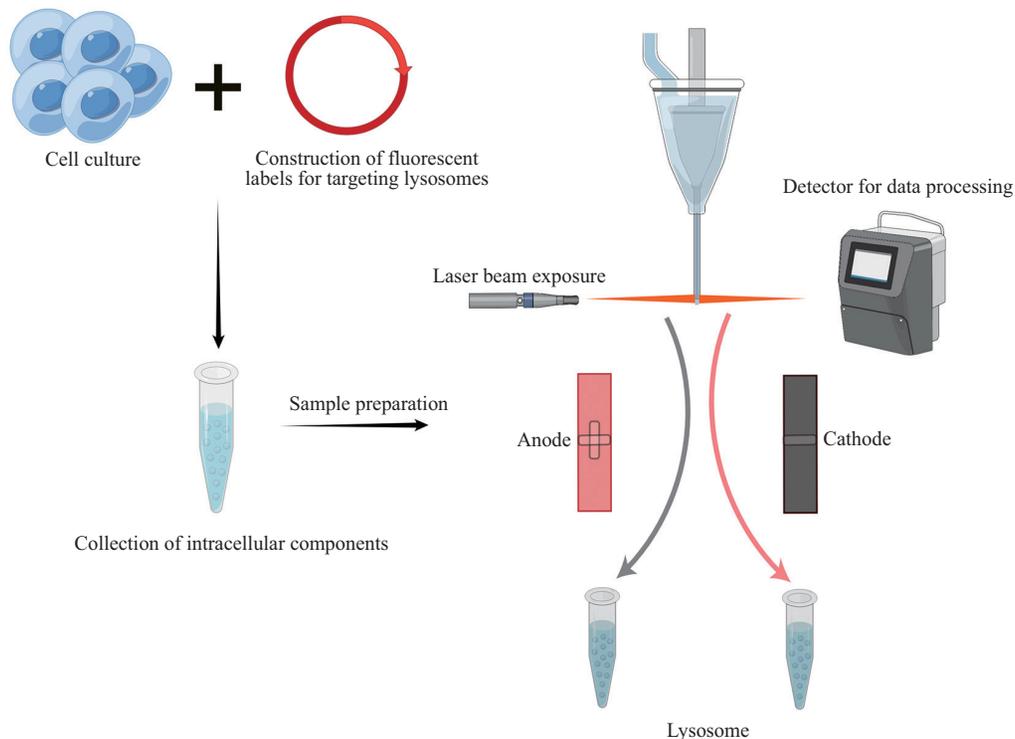
Fig.1 Schematic diagram of centrifugal isolation and purification (modified from the references [28-29])

35%(v/v) Metrizamide, Nycodenz或Histodenz, 进行密度梯度分离<sup>[32-34]</sup>, 以区分开线粒体与溶酶体。同时, 可通过对溶酶体成分进行改变, 如加入 Triton WR-1339 或胶体金使溶酶体密度减小或增加, 从而在密度梯度离心中区分开溶酶体与线粒体、过氧化物酶体等相似密度细胞器<sup>[33]</sup>, 但是这些外部试剂可能对溶酶体功能产生影响。上述密度梯度离心方法常被用于分离小鼠组织及细胞系如 HeLa 细胞和 HFT 细胞的溶酶体。同时可不限于根据目的组分的生物、化学、物理特性来进行分离, 例如从黏度梯度、pH 梯度和密度梯度出发, 考虑扩大梯度介质的适用性<sup>[35]</sup>。离心前的准备也十分重要, 例如选择何种方法破碎细胞, 需从匀浆器的匀浆次数、注射器的使用和超声破碎的时间等方面进行对比分析, 这同时也是需要前期实验积累经验的。

## 2.2 荧光辅助细胞器分选

荧光辅助细胞器分选基于荧光辅助细胞分选的原理, 从细胞匀浆或亚细胞结构分离过程中对标记的胞内细胞器进行分选。当荧光标记的溶酶体通过高

速流动系统时排列成单行, 逐个流经检测区进行测定, 当激光束照射溶酶体时, 由光电倍增管接收产生的荧光和散射光, 将光信号转换成脉冲信号。使这些脉冲信号经过检测器处理, 以分辨不同的细胞器类型。因此, 在电场的作用下, 不同的细胞器会被偏转并进入相应的收集管<sup>[36]</sup>。在一研究中, 研究者成功在大鼠肥大细胞系中稳定表达带红色荧光标签的肥大细胞蛋白酶 (RMCP-DsRed), 由此通过荧光辅助检测和分选得到了带荧光标记的分泌型溶酶体, 且其具有较高的己糖胺酶活性<sup>[37]</sup>。用荧光辅助细胞器分选分离溶酶体准确快速, 能保持细胞器的活力, 并可在无菌条件下进行, 但是仪器昂贵, 以及选择何种蛋白进行荧光标记来准确分选溶酶体是仍需探索的, 多数情况下荧光辅助细胞器分选仅作为研究的手段。当细胞器从流动室流出时, 流动室喷口的超声装置使液流断裂成一连串均匀小滴, 待测细胞器便分散在这些液滴之中, 此时细胞器需克服液流的剪切力<sup>[38]</sup>, 并且液流的剪切力易破碎细胞器, 降低收率。荧光辅助细胞器分选基本过程如图2所示。荧光辅助细胞器分选



在荧光辅助细胞器分选过程中, 首先将样品制备上样, 然后荧光标记的溶酶体通过高速流动系统, 排列成单行, 逐个流经检测区进行测定; 在电场的作用下, 溶酶体会被偏转并进入相应的收集管。

In the fluorescence-assisted organelle sorting process, after sample preparation, the fluorescently labeled lysosomes flow through a high-speed flow system and are arranged in single rows to pass through the detection zone one by one; the lysosomes are deflected under the action of an electric field and enter the corresponding collection tubes.

图2 荧光辅助细胞器分选过程图(根据参考文献[36-37]修改)

Fig.2 Schematic diagram of fluorescence-assisted organelle sorting (modified from the references [36-37])

能够快速准确地分选到溶酶体组分, 但是如何构建理想的荧光标签载体靶向目的溶酶体是仍需研究的, 并且往往需要离心分离首先得到一定纯度的胞内物质作为前期准备。

### 2.3 亲和免疫分离纯化

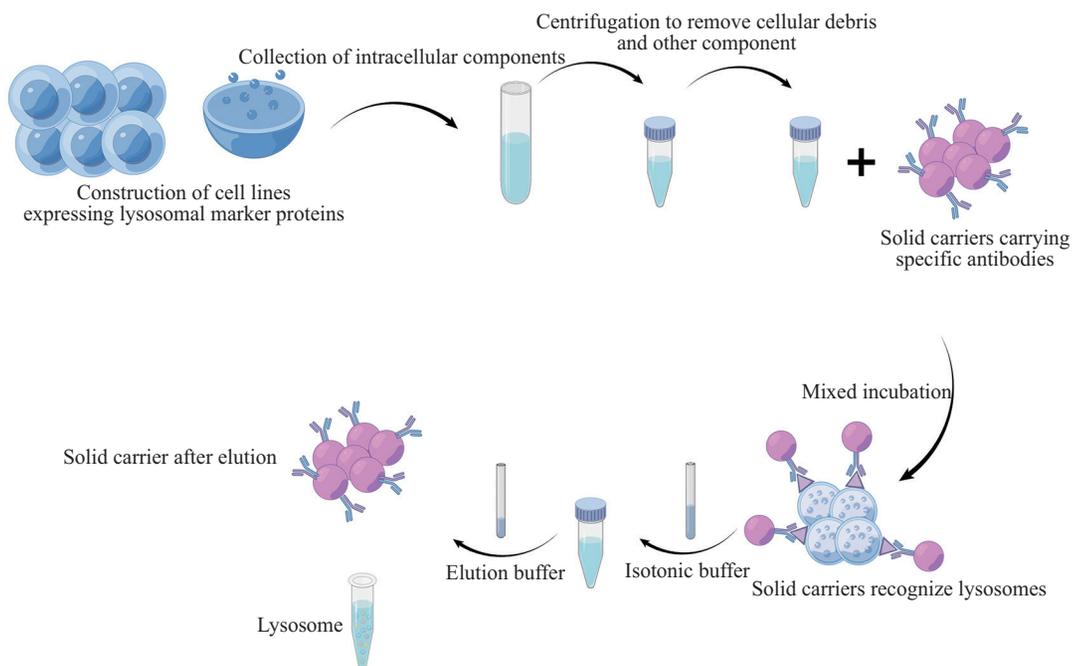
随着越来越多的细胞器标志蛋白被发现, 以及抗体制备的不断成熟, 亲和免疫分离纯化技术这一生物手段不断得到发展。实验室常见的亲和免疫分离纯化流程是首先将识别抗原的抗体与固体载体混合孵育, 固体载体通常为微磁珠<sup>[39]</sup>, 随后破碎稳定表达特异性细胞器标志蛋白的细胞株, 使匀浆液与微磁珠结合一定时间, 用等渗缓冲液去除杂质, 用竞争性洗脱液洗脱得到目的细胞器, 最后进行后续的纯度和定量鉴定<sup>[39]</sup>。这一方法曾在人乳腺癌细胞MCF-7中得到应用, 首先通过特异性抗体识别溶酶体膜上的V型质子泵-合成酶(vesicular-ATPase, V-ATPase) V<sub>1</sub>的A、B结构域, 随后通过磁场分选特异性抗体偶联的铁微磁珠, 最终通过多次洗脱得到溶酶体组分<sup>[40]</sup>。该技术手段的优势在于能够简便地应用于多种细胞类型和生长条件, 得到的细胞器纯度

高, 可分离相似密度的不同细胞器及异质性细胞器, 相对于离心分离能够更好地进行定量鉴定和代谢分析。亲和免疫分离纯化的基本过程如图3所示。

亲和免疫分离纯化技术需要特异性设计和制备抗体, 需要的特异性抗体的量较大, 分离纯化所得到的样品的体积较小, 并且靶向细胞器标志蛋白的抗体亲和性是需要检验的, 如果特异性抗原表位被包埋在内部, 分离效率可能会降低。此外, 洗脱液的洗脱效率和固体载体的选择都是需要考虑的因素, 且在分析鉴定前需要去除洗脱液的影响。

### 2.4 磁性纳米颗粒分离纯化

磁性纳米颗粒分离纯化是基于细胞内吞途径与磁分选原理进行设计的技术手段, 磁性纳米颗粒需要通过乙酰丙酮铁、油酸和油胺等多种化学物质进行高温固相反应来进行制备<sup>[41]</sup>, 且颗粒表面会被加以亲水性或疏水性的修饰。微小的磁性纳米颗粒与培养基中的细胞进行混合孵育, 可通过内吞途径进入胞内, 定位于溶酶体上。磁性纳米颗粒所结合的溶酶体在磁场的作用下进行偏转, 通过磁分选后离心得到的沉淀即为富集的溶酶体。有研究表明,



在亲和免疫分离纯化过程中, 首先匀浆收集表达溶酶体标志蛋白的细胞株, 通过离心操作去除细胞碎片等组分; 将携带特异性抗体的固体载体与胞内组分混合孵育, 去除杂质后洗脱得到目的溶酶体。

In the affinity immunopurification process, cell lines expressing lysosomal marker proteins are first homogenized and collected, and components such as cell debris are removed by centrifugation operation; solid carriers carrying specific antibodies are mixed and incubated with intracellular components, and the target lysosomes are eluted after removing impurities.

图3 亲和免疫分离纯化过程图(根据参考文献[39-40]修改)

Fig.3 Schematic diagram of affinity immunopurification (modified from the references [39-40])

经二巯基琥珀酸(dimercaptosuccinic acid, DMSA)进行表面修饰的磁性纳米颗粒可特异靶向溶酶体<sup>[42]</sup>, 该方法所富集的细胞器可进行后续定量蛋白组分析与相关酶活性检测<sup>[43]</sup>, 能够达到组学分析的高纯度和定量要求。磁性纳米颗粒分离纯化的基本过程如图4所示。

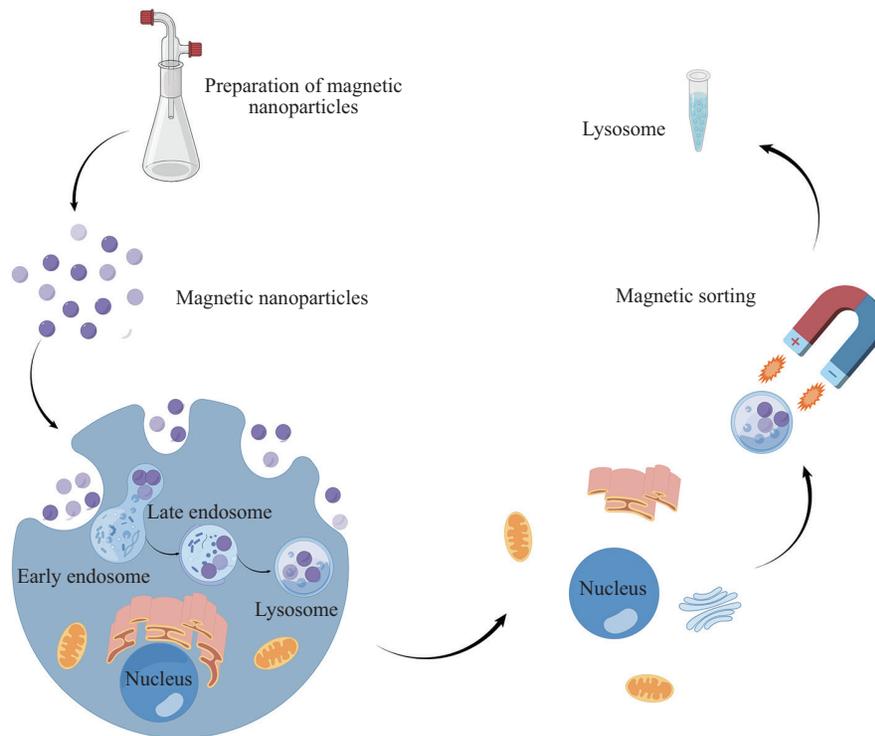
磁性纳米颗粒通过内吞进入胞内这一过程并不能保证细胞正常的生理活动不受影响<sup>[44]</sup>, 并且目前的研究只运用在以人宫颈癌细胞HeLa为代表的贴壁生长型细胞<sup>[43]</sup>, 磁性纳米颗粒分离纯化的适用性还有待考究。制备磁性纳米颗粒是费用昂贵和费时费力的, 并且纳米颗粒能否正常被修饰及避免纳米颗粒聚集为沉淀是具有技术门槛的<sup>[45]</sup>。磁性纳米颗粒的制备影响纳米颗粒能否顺利通过内吞进入细胞内进行定位, 这也说明会有多种不确定的工艺因素降低溶酶体收率。

## 2.5 Lyso-IP

Lyso-IP技术手段是基于配体与配基特异性识

别的原理逐渐发展而来, 与亲和免疫纯化分离应用不同的是融合蛋白表达和配体的可逆结合。其主要过程是运用基因工程的手段将标签蛋白与溶酶体标志蛋白进行融合表达, 并且固体载体带有与标签蛋白可逆结合的配体, 可将目的组分特异性吸达到分离富集的效果。Lyso-IP通过额外构建融合蛋白质载体, 保证了标签蛋白与配体结合的高特异性, 不同的标签蛋白给予富集手段更多选择, 使得分选效率更高, 同时降低了耗材成本。Lyso-IP技术作为一种高效提取完整溶酶体的方法<sup>[46]</sup>, 已经在多项研究中得到了应用。这一方法可通过稳定表达2X FLAG-LAMP1融合蛋白, 并使用带有抗FLAG标签蛋白的磁珠, 在人胚胎肾细胞HEK-293T中亲和分离溶酶体<sup>[46]</sup>。这一方法还可通过稳定表达3X HA-TMEM192融合蛋白, 使用结合有相应配体的磁珠进行亲和<sup>[47]</sup>, 达到富集溶酶体的目的。Lyso-IP基本过程如图5所示。

这种快速的亲和方法能够达到磁性纳米颗粒分

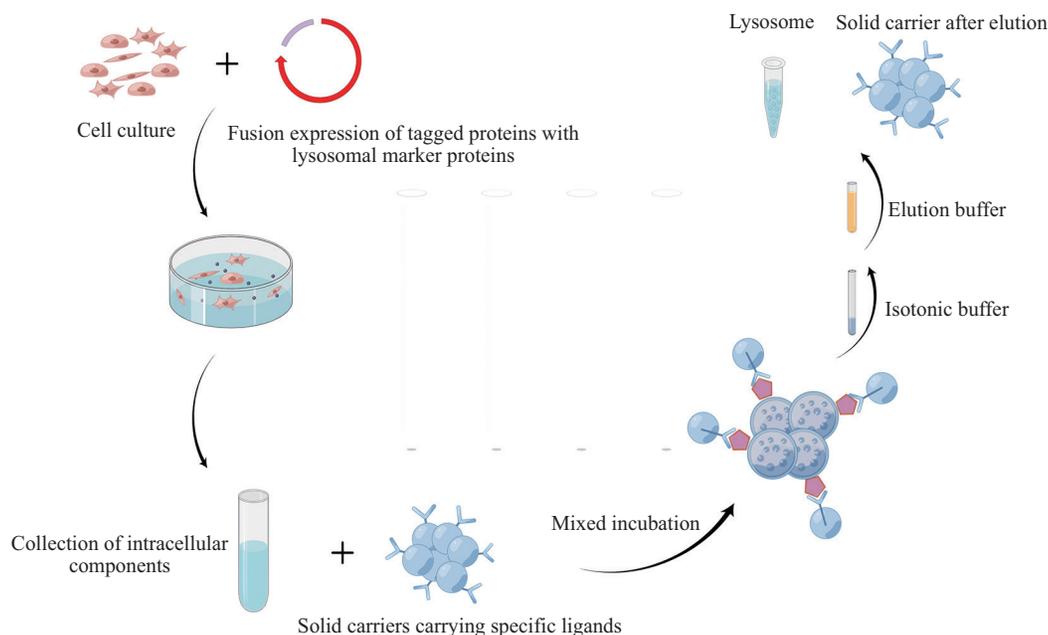


在磁性纳米颗粒分离纯化过程中, 首先通过一系列化学高温固相反应制备磁性纳米颗粒, 颗粒表面可进行亲水性或疏水性修饰; 磁性纳米颗粒与细胞进行混合孵育后通过内吞途径进入胞内, 并定位于溶酶体上; 通过磁场分选磁性纳米颗粒后离心得到富集的溶酶体。

In the process of magnetic nanoparticle isolation and purification, magnetic nanoparticles are firstly prepared by a series of chemical high-temperature solid-phase reactions, and the surface of the particles can be hydrophilically or hydrophobically modified; the magnetic nanoparticles are incubated with cells and then enter the cell through the endocytosis pathway and localize on the lysosomes; the enriched lysosomes are finally obtained by centrifugation after magnetic sorting.

图4 磁性纳米颗粒分离纯化过程图(根据参考文献[42-43]修改)

Fig.4 Schematic diagram of separation and purification of magnetic nanoparticles (modified from the references [42-43])



在Lyso-IP过程中, 首先通过基因工程的手段将标签蛋白与溶酶体标志蛋白进行融合表达; 收集胞内组分后目的溶酶体与携带特异性配体的固体载体结合, 去除杂质后洗脱得到目的溶酶体。

In the process of Lyso-IP, the labeled protein is first genetically engineered to be fused with a lysosomal marker protein; after collecting the intracellular components, the target lysosome is bound to a solid carrier carrying specific ligands, and the target lysosome was eluted after removing the impurities.

图5 Lyso-IP过程图(根据参考文献[46-47]修改)

Fig.5 Schematic diagram of Lyso-IP (modified from the references [46-47])

离纯化的高纯度, 且能够保证一些小分子代谢物在分离过程中被保留<sup>[46]</sup>, 利于后续转录组、蛋白组和代谢组学等分析。标签蛋白的分子量一般较小, 不易影响溶酶体的正常功能活性, Lyso-IP在葡糖脑苷脂酶(*glucocerebrosidase*)的临床检测研究<sup>[48]</sup>, 以及核糖体自噬相关信号通路研究的疾病模型中得到了运用<sup>[49]</sup>。但是这一方法在不同细胞系和疾病模型中的应用和改进仍有一定的空白, 达到高纯度的同时如何保证达到高产量这一问题亟待解决, 并且磁珠的粒径、材质、渗透性等影响因素都应在制备过程进行斟酌<sup>[50]</sup>。

### 3 总结与展望

溶酶体作为协调细胞物质转运、代谢和分泌的重要细胞器, 高效快速地分离纯化溶酶体有助于研究其相关功能和稳态调控机制, 揭示机体多种生理活动和相关重大疾病的发生发展。溶酶体分离纯化技术既是生命科学研究中的重要手段, 也是亟待创新的生物技术研究方向。

现有溶酶体分离纯化技术在不断发展, 根据实际条件如裂解方式、梯度介质和离心步骤的组合对离心分离技术进行摸索和优化, 能够达到富集的基本要求。但离心技术尚无法将具有相似密度、大小

的不同细胞器分离开, 目的组分的损失和杂质污染难以避免。传统离心技术能够一次性对大量的细胞或组织粗提液进行分离纯化, 方便快捷地对目的溶酶体组分进行定量或半定量蛋白组学的分析, 评估溶酶体相关蛋白的相对丰度<sup>[51]</sup>。荧光辅助细胞器分选能够分离高度纯化的细胞器群体<sup>[38]</sup>, 但在分选过程中单个溶酶体可能会破裂。目前荧光辅助细胞器分选多用于在单个细胞器上进行共定位研究, 鉴定互作分子, 以及细胞器电生理研究, 例如用亲脂性荧光探针(*trimethylamino-diphenylhexatriene*)分选MDCK细胞的内吞囊泡, 鉴定新的内吞蛋白<sup>[52]</sup>; 通过荧光标记Rhodamine-123分选线粒体, 可判断线粒体的膜电位变化和活性<sup>[53]</sup>。如果能改进高速流动系统, 减小液流剪切力对细胞器的损伤, 荧光辅助细胞器分选技术将能够在研究甚至生产中达到更高的实践性。亲和免疫纯化分离能够达到高特异性的分选富集, 分离相似密度的不同细胞器和异质型细胞器, 研究者曾在MCF-7细胞中通过亲和免疫纯化得到溶酶体, 该溶酶体组分能够满足溶酶体蛋白丰度比较的需求, 通过质谱分析差异蛋白<sup>[40]</sup>。与离心分离纯化相比, 该方法步骤简单, 但需要制备特异性抗体, 且溶酶体物质的产量有限。虽然包括细胞数量和抗体

数量在内的条件可以相应地放大,以提高溶酶体产量,但实验成本昂贵。

磁性纳米颗粒分离纯化能够达到相对更高的收率,并且磁性纳米颗粒通过修饰和改造后,具有细胞内示踪的潜力。研究者曾在成纤维细胞中使用超顺磁性胶体铁葡聚糖颗粒介导内吞途径,该方法分离得到的溶酶体能够满足酶活测定和溶酶体蛋白的2D-PAGE分析的需求<sup>[39]</sup>。同时,这一方法在NPC1缺陷细胞中可通过超顺磁性氧化铁纳米颗粒介导内吞途径,分选得到的溶酶体能够满足脂质组学分析的产量和纯度要求<sup>[54]</sup>。磁性纳米颗粒分离纯化能够在有限的实验材料中得到满足下游组学分析需求的目的组分,这也使溶酶体相关疾病模型或临床样本的亚细胞结构分离成为可能。值得注意的是,因磁性纳米颗粒属于外部试剂,可能会对溶酶体活性产生影响,所以需要细胞的生理活动进行监测。此外,纳米颗粒的制备和功能性探究需要不断与成本相结合,才能达到更高的实验室适用性。

Lyso-IP是一种快速分选溶酶体的方法,它不仅能够保证目的组分的高纯度和完整性,还能够保留一定的代谢物组分。但在Lyso-IP过程中,研究人员需要关注细胞系构建和固体载体的选择,以提高该技术的可操作性。研究者曾在HEK-293T细胞中稳定表达2X FLAG-mRFP-LAMP1融合蛋白,通过带有抗FLAG标签蛋白的磁珠亲和分离到溶酶体,目的溶酶体组分能够用于以溶酶体胆固醇测定为代表的代谢组学研究<sup>[55]</sup>。通过Lyso-IP方法分离的溶酶体已成功地用于蛋白质组学、脂质组学和代谢组学分析<sup>[46,48-49,55]</sup>。Lyso-IP若能通过构建嵌合动物模型,如Lyso-tag和Mito-tag,应用于不同的动物疾病模型,将更广泛地帮助回答生物学和生理学问题,并且将在信号通路、分子机制和疾病研究等领域发挥更大的作用。同时,基于以上方法的商用试剂盒生产有待开发和创新。

在研究和生产过程中需密切结合实际条件进行实验设计和改进,荧光辅助细胞器分选、亲和免疫纯化及Lyso-IP技术日渐成熟,能够保证小批量次的溶酶体收率、完整性和特异性,涉及细胞层面的溶酶体分离纯化可优先考虑以上方法。磁性纳米颗粒分离纯化技术涉及更高的学科交叉技术门槛,实验成本需要仔细考虑。离心分离纯化是组织及动物模型层面溶酶体分离纯化的首选方案,但样品的大

量制备是仍需解决的问题。现有溶酶体分离纯化技术亟待创新的方向,一是如何提高溶酶体分离纯化的收率、完整性和特异性,并且降低样品的大量制备,二是如何将现有溶酶体分离纯化技术成熟地运用于组织及动物模型。随着生物技术的迅猛发展,我们期待着不断有新的突破出现,以填补目前溶酶体分离纯化技术方面的空白。

### 参考文献 (References)

- [1] DE DUVE C, PRESSMAN B C, GIANETTO R, et al. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue [J]. *Biochem J*, 1955, 60(4): 604-17.
- [2] RONEY J C, CHENG X T, SHENG Z H. Neuronal endolysosomal transport and lysosomal functionality in maintaining axonostasis [J]. *J Cell Biol*, 2022, 221(3): e202111077.
- [3] ABBAS Y M, WU D, BUELER S A, et al. Structure of V-ATPase from the mammalian brain [J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1240-6.
- [4] ZHAO J H, BENLEKBIR S, RUBINSTEIN J L, et al. Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase [J]. *Nature*, 2015, 521(7551): 241-5.
- [5] ZHENG P, OBARA C J, SZCZESNA E, et al. ER proteins decipher the tubulin code to regulate organelle distribution [J]. *Nature*, 2022, 601(7891): 132-8.
- [6] SATORI C P, KOSTAL V, ARRIAGA E A. Review on recent advances in the analysis of isolated organelles [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 753: 8-18.
- [7] LAWRENCE R E, ZONCU R. The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(2): 133-42.
- [8] GONZÁLEZ A, HALL M N, LIN S C, et al. AMPK and TOR: the Yin and Yang of cellular nutrient sensing and growth control [J]. *Cell Metab*, 2020, 31(3): 472-92.
- [9] NAPOLITANO G, ESPOSITO A, CHOI H, et al. mTOR-dependent phosphorylation controls TFEB nuclear export [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3312.
- [10] SETTEMBRE C, FRALDI A, MEDINA D L, et al. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(5): 283-96.
- [11] HURLEY J H, YOUNG L N. Mechanisms of autophagy initiation [J]. *Annu Rev Biochem*, 2017, 6: 225-44.
- [12] CULLEN P J, STEINBERG F. To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(11): 679-96.
- [13] SANTANA-CODINA N, MANCIAS J D, KIMMELMAN A C. The role of autophagy in cancer [J]. *Annu Rev Cancer Biol*, 2017, 1: 19-39.
- [14] PLUVINAGE J V, HANEY M S, SMITH B A H, et al. CD22 blockade restores homeostatic microglial phagocytosis in ageing brains [J]. *Nature*, 2019, 568(7751): 187-92.
- [15] FÜLLGRABE J, KLIONSKY D J, JOSEPH B. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 65-74.
- [16] GANLEY I G. Autophagosome maturation and lysosomal fusion

- [J]. *Essays Biochem*, 2013, 55: 65-78.
- [17] REN H, WANG G. Autophagy and lysosome storage disorders [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1207: 87-102.
- [18] WANG X, YANG C. Programmed cell death and clearance of cell corpses in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(11/12): 2221-36.
- [19] ARAKAWA S, TSUJIOKA M, YOSHIDA T, et al. Role of Atg5-dependent cell death in the embryonic development of Bax/Bak double-knockout mice [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(9): 1598-608.
- [20] BALLABIO A, GIESELMANN V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(4): 684-96.
- [21] BARGAL R, AVIDAN N, BEN-ASHER E, et al. Identification of the gene causing mucopolipidosis type IV [J]. *Nat Genet*, 2000, 26(1): 118-23.
- [22] PLATT F M. Emptying the stores: lysosomal diseases and therapeutic strategies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(2): 133-50.
- [23] KIMMELMAN A C, WHITE E. Autophagy and tumor metabolism [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(5): 1037-43.
- [24] PERERA R M, STOYKOVA S, NICOLAY B N, et al. Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism [J]. *Nature*, 2015, 524(7565): 361-5.
- [25] NAVARRO-ROMERO A, MONTPEYÓ M, MARTINEZ-VICENTE M. The emerging role of the lysosome in Parkinson's disease [J]. *Cells*, 2020, 9(11): 2399.
- [26] HARA T, NAKAMURA K, MATSUI M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice [J]. *Nature*, 2006, 441(7095): 885-9.
- [27] CHRISTOPHER J A, GELADAKI A, DAWSON C S, et al. Subcellular transcriptomics and proteomics: a comparative methods review [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2022, 21(2): 100186.
- [28] 周梦, 史熊杰. 体外培养细胞中细胞器的分离与纯化[J]. 生物化工(ZHOU M, SHI X J. Isolation and purification of organelles from cultured cells *in vitro* [J]. *Biochemical Engineering*), 2021, 7(4): 130-4.
- [29] LIVSHITS M A, KHOMYAKOVA E, EVTUSHENKO E G, et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: theoretical analysis of a commonly used protocol [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17319.
- [30] SPINNROCK A, CÖLFEN H. Putting a new spin on it: gradient centrifugation for analytical and preparative applications [J]. *Chemistry*, 2019, 25(43): 10026-32.
- [31] PRENTZELL M T, REHBEIN U, SANDOVAL M C, et al. G3BPs tether the TSC complex to lysosomes and suppress mTORC1 signaling [J]. *Cell*, 2021, 184(3): 655-74, e27.
- [32] AGUADO C, PÉREZ-JIMÉNEZ E, LAHUERTA M, et al. Isolation of lysosomes from mammalian tissues and cultured cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1449: 299-311.
- [33] CAROSI J M, HATTERSLEY K J, CUI Y, et al. Subcellular fractionation of HeLa cells for lysosome enrichment using a continuous percoll-density gradient [J]. *Bio Protoc*, 2019, 9(18): e3362.
- [34] HEO J M, ORDUREAU A, SWARUP S, et al. RAB7A phosphorylation by TBK1 promotes mitophagy via the PINK-PARKIN pathway [J]. *Sci Adv*, 2018, 4(11): eaav0443.
- [35] QIU P, MAO C. Viscosity gradient as a novel mechanism for the centrifugation-based separation of nanoparticles [J]. *Adv Mater*, 2011, 23(42): 4880-5.
- [36] GAUTHIER D J, SOBOTA J A, FERRARO F, et al. Flow cytometry-assisted purification and proteomic analysis of the corticotropes dense-core secretory granules [J]. *Proteomics*, 2008, 8(18): 3848-61.
- [37] RAJOTTE D, STEARNST C D, KABCENELL A K. Isolation of mast cell secretory lysosomes using flow cytometry [J]. *Cytometry A*, 2003, 55(2): 94-101.
- [38] THARKESHWAR A K, GEVAERT K, ANNAERT W. Organellar omics-A reviving strategy to untangle the biomolecular complexity of the cell [J]. *Proteomics*, 2018, 18(5/6): e1700113.
- [39] DIETRICH O, MILLS K, JOHNSON A W, et al. Application of magnetic chromatography to the isolation of lysosomes from fibroblasts of patients with lysosomal storage disorders [J]. *FEBS Lett*, 1998, 441(3): 369-72.
- [40] NYLANDSTED J, BECKER A C, BUNKENBORG J, et al. ErbB2-associated changes in the lysosomal proteome [J]. *Proteomics*, 2011, 11(14): 2830-8.
- [41] SANNERUD R, ESSENLENS C, EJSMONT P, et al. Restricted Location of PSEN2/ $\gamma$ -secretase determines substrate specificity and generates an intracellular A $\beta$  pool [J]. *Cell*, 2016, 166(1): 193-208.
- [42] THARKESHWAR A K, DEMEDTS D, ANNAERT W. Superparamagnetic nanoparticles for lysosome isolation to identify spatial alterations in lysosomal protein and lipid composition [J]. *STAR Protoc*, 2020, 1(3): 100122.
- [43] LE T S, TAKAHASHI M, MAENOSONO S. A robust nanoparticle-based magnetic separation method for intact lysosomes [J]. *Bio Protoc*, 2022, 12(13): e4453.
- [44] SINGH J, KAADE E, MUNTEL J, et al. Systematic comparison of strategies for the enrichment of lysosomes by data independent acquisition [J]. *J Proteome Res*, 2020, 19(1): 371-81.
- [45] CASTELLANO B M, THELEN A M, MOLDAVSKI O, et al. Lysosomal cholesterol activates mTORC1 via an SLC38A9-Niemann-Pick C1 signaling complex [J]. *Science*, 2017, 355(6331): 1306-11.
- [46] ABU-REMAILEH M, WYANT G A, KIM C, et al. Lysosomal metabolomics reveals V-ATPase- and mTOR-dependent regulation of amino acid efflux from lysosomes [J]. *Science*, 2017, 358(6364): 807-13.
- [47] CHEN C, SIDRANSKY E, CHEN Y. Lyso-IP: uncovering pathogenic mechanisms of lysosomal dysfunction [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(5): 616.
- [48] NEUMANN J, BRAS J, DEAS E, et al. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease [J]. *Brain*, 2009, 132(Pt 7): 1783-94.
- [49] WYANT G A, ABU-REMAILEH M, FRENKEL E M, et al. NU-FIP1 is a ribosome receptor for starvation-induced ribophagy [J]. *Science*, 2018, 360(6390): 751-8.
- [50] CHEN W W, FREINKMAN E, WANG T, et al. Absolute quantification of matrix metabolites reveals the dynamics of mitochondrial metabolism [J]. *Cell*, 2016, 166(5): 1324-37, e11.
- [51] CHAPEL A, KIEFFER-JAQUINOD S, SAGNÉ C, et al. An extended proteome map of the lysosomal membrane reveals novel potential transporters [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(6): 1572-88.
- [52] FIALKA I, STEINLEIN P, AHORN H, et al. Identification of

- syntenin as a protein of the apical early endocytic compartment in Madin-Darby canine kidney cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(37): 26233-9.
- [53] O'CONNOR J E, VARGAS J L, KIMLER B F, et al. Use of rhodamine 123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver mitochondria [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 151(1): 568-73.
- [54] THARKESHWAR A K, TREKKER J, VERMEIRE W, et al. A novel approach to analyze lysosomal dysfunctions through sub-cellular proteomics and lipidomics: the case of NPC1 deficiency [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41408.
- [55] CASTELLANO B M, THELEN A M, MOLDAVSKI O, et al. Lysosomal cholesterol activates mTORC1 via an SLC38A9-Niemann-Pick C1 signaling complex [J]. *Science*, 2017, 355(6331): 1306-11.