



生物样本中多组分同时提取技术的应用与前景*

张坤鹏¹⁾ 叶子弘^{1)**} 薛志超^{2)**}⁽¹⁾ 中国计量大学生命科学学院, 杭州 310018; ⁽²⁾ 中国计量科学研究院, 北京 100029

摘要 随着生物医药领域的快速发展, 从生物样本中提取多种分子组分已成为研究的关键步骤。同时提取多种组分可确保各组分在提取过程中的生理状态一致性, 这对于全面理解生物系统至关重要。同时提取代谢物、蛋白质和核酸 (DNA 和 RNA) 相比传统提取方法在时间和资源效率、样品完整性、数据整合以及成本效益方面有很大的优势, 已成为生物样本分析中的关键环节。这种综合方法通过保持各组分的一致性, 不仅提高了样本的利用效率, 还减少了样本处理过程中的损失和污染, 为后续的基因组学、转录组学和代谢组学研究提供了可靠的数据支持。在系统生物学研究, 特别是多组学整合分析中, 从有限的生物样本中同时提取多种生物分子 (如 DNA、RNA、蛋白质和代谢物) 对于全面理解生物系统至关重要。本文综述了近年来在同时提取代谢物和核酸方面的研究进展, 重点介绍了不同方法的原理、优化策略及其应用。通过优化提取流程和使用先进的试剂和技术, 可以显著提高提取效率和样本质量, 为多组学研究提供了可靠的样本准备方法。未来的研究应继续探索新的提取方法和技术, 以进一步提高样本处理的效率和准确性。

关键词 多组学研究, 代谢物提取, 核酸提取, 双重提取方法, TRIzol 试剂法

中图分类号 Q503, Q52, R318.08

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0465

CSTR: 32369.14.pibb.20250465

在当今生物医学领域, 多组学 (multi-omics) 研究正以惊人的速度蓬勃发展, 成为推动生命科学和医学研究不断向前迈进的核心驱动力。近年来, 重大疾病研究领域不断涌现突破性成果, 而多组学技术在其中扮演了关键角色。以癌症研究为例, 通过整合基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学等多层面数据, 能够全面解析肿瘤的发生、发展机制以及肿瘤细胞的异质性。同时, 随着生物学研究的不断深入, 多组学技术已成为揭示复杂生物学过程的核心工具。借助基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学和表观基因组学等多个层面的数据, 研究人员能够全面探究生物体内的分子机制^[1-3]。多组学技术不仅加深了对生物体复杂性和多样性的理解, 还为临床诊断、疾病机制研究、药物靶点发现及个性化医疗提供了宝贵信息。然而, 多组学研究在样本制备环节面临诸多挑战, 尤其是从同一样本中提取多种生物分子时, 传统方法由于需要对不同生物分子分别提取, 不仅操作烦琐、耗时长, 还可能导致样本损失和数据偏差。首先, 样本损失是一个关键问题。在传统提取方法中, 核酸

和代谢物的提取通常需要分别进行, 这意味着样本需要被分割成多份, 每一份都用于特定的提取过程。这种多次处理不仅增加了样本的损失风险, 还可能导致样本的不均匀性, 影响后续分析的准确性^[4-5]。在单细胞蛋白质组学研究中, 多步法处理流程复杂, 涉及多次移液操作, 这会显著增加样本损失, 降低检测结果的可重复性和蛋白质定量的可信度^[6]。其次, 样本污染也是一个严重问题。在提取过程中, 样本可能会受到多种污染, 包括实验室环境中的微生物、试剂中的杂质等。这些污染不仅会影响样本的质量, 还可能导致错误的分析结果。在研究低微生物生物量环境时, 样本间交叉污染 (如孔间 DNA 渗漏) 是一个突出的问题^[7]。样本降解也是一个不可忽视的问题。核酸提取通常需

* 浙江省“尖兵领雁+X”科技计划 (2025C02125), 国家重点研发计划 (2021YFF0600800) 和中国计量科学研究院基本科研业务费 (AKYCX2516) 资助项目。

** 通讯联系人。

叶子弘 Tel: 13656686088, E-mail: zhye@cjl.u.edu.cn

薛志超 Tel: 18612081916, E-mail: xuezc@nim.ac.cn

收稿日期: 2025-10-28, 接受日期: 2026-04-02

要在低温条件下进行以防止核酸酶的降解, 但代谢物提取可能需要不同的条件^[8]。这种不同提取条件的差异可能导致样本在处理过程中的降解, 影响后续分析的准确性。例如, 福尔马林固定石蜡包埋 (formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE) 的组织样本在提取环节降解严重, 影响后续实验的成功率。

同时, 不同提取条件还可能导致数据偏差。核酸和代谢物的提取条件不同可能会导致生物分子的生理状态不一致, 进而影响后续多组学数据的整合和分析。传统的联合蛋白质组学和代谢组学研究中, 样本通常是从不同标本中分别制备的, 这可能导致蛋白质组学和代谢组学数据之间的不一致性被错误地解释为这两个层面之间的调控相互作用, 而实际上可能是由样本变异性引起的^[9]。传统的分别提取方法由于需要对不同生物分子分别进行处理, 存在诸多问题, 如样本损失、操作烦琐、数据一致性差等。而同时提取技术则在这些方面展现出显著的优势。表1详细对比了同时提取和分别提取方法在多个关键方面的表现, 为研究人员提供了直

观的参考。

本研究团队长期致力于生物样本处理与分析技术的探索, 尤其在肾癌细胞研究领域, 有着深厚的研究基础和实践经验。目前已开展多项针对肾癌细胞的实验, 深入研究肾癌细胞的生物学特性和病理机制, 对肾癌细胞的样本处理有着独到的见解和成熟的技术方案, 同时也积累了大量关于细胞样本处理和分析的经验。在研究过程中, 从生物样本中高效、准确地提取多种生物分子对于后续的基因组学、转录组学和代谢组学分析至关重要, 因此团队成员一直密切关注生物样本同时提取技术领域的最新进展, 并积极将其应用于研究中。同时提取多种生物分子具有重要意义, 一方面, 它能确保各组分在提取过程中的生理状态一致性, 这对于全面理解生物系统至关重要。另一方面, 相比分别提取, 同时提取可显著提高样本的利用效率, 保证各组分在提取过程中的一致性, 减少样本处理过程中的损失和污染, 降低实验成本, 简化实验流程, 还能确保数据的可比性和可靠性, 为后续多组学整合分析提供更准确的基础。

Table 1 Comparison of simultaneous extraction methods with single extraction methods^[4-9]
表1 同时提取方法与单一提取方法比较^[4-9]

对比项目	分别提取	同时提取
样本利用效率	较低, 需大量样本分别进行不同提取	较高, 从同一小组织样品中同时提取多种组分
操作步骤复杂性	较高, 需针对不同组分采用不同提取方法和条件	较低, 采用统一提取流程处理多种组分
样本损失	较多, 多次提取导致样本消耗大	较少, 减少处理次数和步骤, 降低损失风险
数据一致性	较差, 不同提取过程可能导致组分间生理状态差异	较好, 确保各组分在提取过程中的生理状态一致性
实验成本	较高, 需多种提取试剂和设备	较低, 减少试剂和设备使用, 节省成本
实验时间	较长, 需分步骤进行多次提取	较短, 能同时提取多种组分, 提高工作效率
结果可靠性	较低, 数据整合时可能存在偏差和误差	较高, 提供准确基础, 确保数据可比性和可靠性

近10年来, 同时提取多种生物分子的技术取得了突破性进展。例如 TRIzol 试剂法和改良 Folch 法等, 它们在提取代谢物、脂质、核酸等生物分子时展现出显著优势。这些技术能从有限样本中高效回收并同时提取多种生物分子, 减少样本消耗, 降低多次提取导致的数据偏差, 提高多组学数据准确性和整合性。同时提取技术满足了多组学研究对全面数据整合的需求, 优化提取效率、提高数据质量并减少实验干扰。国内研究机构如中国计量科学研究院等也积极参与相关研究, 对提取方法优化和标准化进行探索, 并在临床样本分析等方面取得一定成果。

同时提取技术被广泛应用于多个领域。在临床研究中, 同时提取技术可从珍贵临床样本中提取多种生物分子, 用于疾病机制研究和生物标志物发现。在植物研究领域, 它分析植物组织代谢物和核酸, 助力植物代谢调控和基因功能研究^[9]。此外, 微生物研究也利用同时提取技术探索微生物群落组成和代谢功能。例如, 有研究从土壤等环境样本中同时提取微生物 DNA、RNA 和代谢物, 分析微生物群落结构、功能及环境适应机制, 为环境微生物学和生态学研究提供重要支持^[10]。

近年来, 微流控技术、磁珠法、自动化平台及单细胞分析等前沿技术的进步, 为同时提取技术向

更高效率、更高通量和更精准方向演进提供了关键动力。这些技术的融合应用正在塑造同时提取技术的新范式：微流控技术通过其微型化、集成化的特点，有望实现“样品进-结果出”的一体化同时提取与在线分析^[11]；磁珠法则以其高效、易控的特性，成为自动化、高通量同时提取平台中实现组分特异性分离的理想载体^[12]；而单细胞多组学研究的兴起，对从极微量样本中并行获取多种分子信息提出了迫切需求，直接驱动了适用于单细胞水平的超灵敏、低损耗同时提取方法的开发^[13]。未来，通过跨技术集成与流程优化，同时提取技术有望在自动化、标准化及微量样本处理能力上实现突破。

目前，同时提取技术已取得显著进展，但仍面临诸多挑战。现有方法虽具优势，但也存在局限性，如 TRIzol 试剂法中代谢物稳定性不足，改良 Folch 法依赖高成本商业试剂盒等。提取过程中的样本降解、提取效率和纯度不稳定等问题依然存在。未来需优化溶剂体系、开发新型裂解试剂、结合自动化技术提升效率和准确性。本文旨在系统梳理近年来在同时提取技术领域的创新成果，深入剖析各类提取方法的特性，并展望其未来发展趋势，以为科研工作者提供更具针对性和前瞻性的参考，推动该技术在多组学研究中更广泛且深入的应

用。同时，标准化提取方案建立、质量控制体系完善以及跨学科合作加强也是重要发展方向，以推动该技术在多组学研究中更广泛的应用。

1 同时提取技术的优势

作为一种整合性的样本前处理策略，同时提取技术的核心价值在于其系统性。同时提取技术通过方法学的革新，直接回应了多组学研究中“同源性”与“一致性”的根本要求。首先根据图1所示，在同一块肿瘤组织中提取核酸、蛋白质和代谢物，由于是将样本分割成了很多块，所以每一块小样本的组分就可能并不一致。例如，核酸提取过程中可能因核酸酶污染而降解，蛋白质可能因反复冻融或长时间暴露而变性，代谢物则可能因氧化或水解而损失。其次，不同提取条件可能导致生物分子的生理状态不一致，影响后续多组学数据的整合和分析。例如，核酸提取通常需要低温操作，而代谢物提取可能需要中性或弱酸性条件，这种差异可能导致代谢物的相对丰度发生变化，进而影响代谢组学与转录组学数据的关联分析。最后，分别提取需要使用多种不同的试剂和设备，增加了实验成本和时间。例如，核酸提取需要专门的试剂盒，蛋白质提取需要裂解缓冲液和纯化柱，代谢物提取

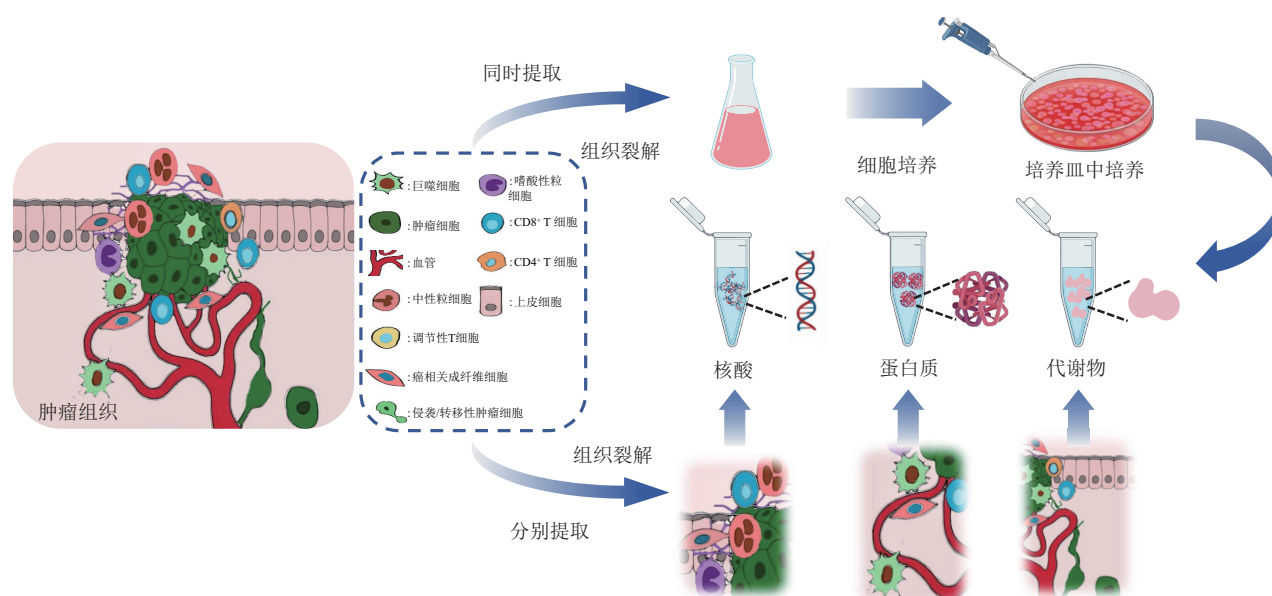


Fig. 1 Sequential extraction vs. simultaneous extraction techniques

图1 分别提取技术与同时提取技术

本图展示了分别提取方法的基本流程，从同一样本中提取代谢物、RNA和蛋白质时所需的不同步骤和提取条件。每种组分的提取需单独进行，增加了样本处理的复杂性，并可能导致样本损失和数据一致性差的问题。同时也展示了同时提取技术的流程图。不同于分别提取技术，所有生物分子在同一提取流程中被同时回收，确保了各组分在提取过程中的生理状态一致性，减少了样本损失和污染，提升了数据的准确性和可靠性。

则需要有机溶剂和萃取装置。每次提取都需要单独的操作步骤, 导致实验时间大幅增加, 尤其在大规模样本分析中, 成本和时间的增加更为显著。这些问题不仅降低了样本的利用效率和数据的可靠性, 还限制了多组学研究的广泛应用。

同时提取技术实现了从单一小组织样品中获取多种生物分子, 从而在样品量有限的情况下实现更全面的分析。如图1所示, 同时提取技术直接从同一组织样本中提取多种生物分子, 这就保证了各组分的一致性。例如, 在人脑癌细胞和组织的研究中, 优化的双重提取过程使得从同一样品中同时提取代谢物和RNA成为可能, 极大地促进了整合代谢组学和转录组学的研究。这种同时提取的创新方式不仅有效节省了样品准备的时间, 还为高通量研究和快速分析提供了便利, 尤其在油棕系统生物学研究中, 通过采用一种全能的综合提取方法, 能够快速获得关键生物数据^[10]。更为重要的是, 同时提取的过程能够最小化样品在提取过程中的降解风险^[14]。这一特性确保了生物分子在其最完整、最具代表性的状态下进行后续分析。例如, 在使用TRIzol试剂从同一样品中分离代谢物和脂质时, 代谢物和脂质的完整性得到了良好保留, 从而为多组学分析提供了准确的基础。此外, 同时提取还确保了样品在不同类型分析中的生理状态一致性, 这对于获得可比较和可靠的数据尤为重要, 尤其是在研究不同生物分子之间的相互作用时。如图1所示, 从同一组织中提取核酸、蛋白质和代谢物时, 同时提取技术与分别提取技术存在显著差异。使用不同提取方法获取同一组织的不同组分, 可能导致提取物质的量不足或质量不稳定。而同时提取技术能够确保从同一组织中提取的不同组分在数量和质量上的一致性和稳定性, 为后续多组学分析提供可靠的样本基础。此外, 在处理严重降解的样品时, 采用新型的整合提取方案可以有效确保生物分子的质量, 进而提高数据的可靠性。

同时提取技术在多组学研究中具有显著优势, 其重要性随着研究深入日益凸显。在基础操作层面, 该技术简化了提取流程, 减少了烦琐步骤和样本转移次数, 降低了操作难度和实验失误概率。改良Folch法整合了液氮冷冻研磨、溶剂萃取和商业试剂盒纯化等步骤, 形成标准化操作流程, 减少了样本损失, 提高了实验可重复性和成功率。在人脑癌细胞和组织研究中, 优化的双重提取过程可同时提取代谢物和RNA, 与传统方法相比, 样本处理

时间大幅缩短, 为高通量研究和快速分析提供了有力支持。在数据质量层面, 同时提取技术减少了样本降解风险, 确保了生物分子的完整性, 提高了数据准确性。以TRIzol试剂法为例, 4°C操作可抑制核酸酶活性, 保护RNA完整性。通过该方法提取的核酸(尤其是RNA)纯度高, RNA的完整性值(RNA integrity number, *RIN*)通常大于6.5, 提取效率和纯度均高于传统RNA单独提取方法^[14]。同时提取技术还能确保各组分在提取过程中的生理状态一致性, 增强数据一致性, 为系统生物学研究提供了重要依据。通过表2的对比, 研究人员可以根据样本类型、实验目标和资源条件, 选择最适合的提取方法。例如, 对于需要同时提取多种生物分子且样本量有限的研究, 改良Folch法可能是最佳选择, 而对于需要快速、低成本提取代谢物和RNA的研究, 甲醇/氯仿萃取法可能更为合适。表2可为研究人员提供一个全面的参考框架, 可以根据具体的研究目标和条件, 做出更合理的实验设计和方法选择。

从研究成本层面来看, 同时提取技术减少了所需试剂和设备种类, 降低了实验人力成本。TRIzol试剂法通过顺序分离代谢物和脂质, 消除了对多种提取试剂盒和设备的需求, 降低了实验成本。在大规模研究中, 这种成本效益尤为明显, 研究人员可将更多精力投入到数据分析和结果解释上。例如, Tyagi团队^[15]在比较不同肾脏组织(肿瘤和非肿瘤组织)的代谢物水平时, 采用的联合提取方法展现了良好的重现性, 变异系数(*CV*)≤20%, 表明提取过程技术误差小, 数据稳定。

最后, 在适用范围层面, 同时提取技术展现了广泛的通用性和灵活性。无论是在陆生植物、水生生物还是哺乳动物组织中, 该技术都能有效提取多种生物分子。改良Folch法已在小鼠肝脏、肿瘤组织、大豆组织、金鱼组织等多种样本中得到验证, 证明了其广泛的适用性。同时, 该技术可根据具体研究需求进行优化和定制, 研究人员可根据样本特性和研究目的, 调整溶剂比例、提取时间等参数, 以达到最佳提取效果, 满足不同研究需求。在大豆组织提取应用中, 改良Folch法能同时提取极性代谢物(如氨基酸、有机酸等)、非极性代谢物(如脂肪酸、磷脂等)以及DNA、RNA和蛋白质, 为研究大豆生长发育和代谢过程提供全面数据支持。在水生生物样本(如金鱼组织)提取中, 该方法能有效分离多种生物分子, 为研究金鱼生理代谢和营养需求提供重要数据支持。

Table 2 An overview of simultaneous extraction methods and their advantages and disadvantages^[4-5, 15]

表2 同时提取方法及优缺点概述^[4-5, 15]

方法	操作原理	适用对象	提取分子	溶剂体系	优点	缺点	应用实例
甲醇/氯仿萃取法	使用甲醇和氯仿混合液，通过分层分配使代谢物与核酸分开。代谢物在有机相中，核酸在水相中	多种生物样本	代谢物、RNA、蛋白质	甲醇：水：氯仿（1：1：3或1：1：2， $v:v:v$ ）	操作简单、成本低、适用范围广；能高效提取代谢物、RNA和蛋白质	对脂质提取效果差，RNA质量可能受污染；需要优化溶剂比例以提高脂质提取效果	多组学分析，特别适用于大规模分析
TRIzol试剂法	使用 TRIzol 试剂，通过酚和异硫氰酸胍裂解细胞，并通过氯仿分相分离	多种生物样本	代谢物、脂质、RNA、蛋白质	TRIzol试剂（含氯仿）	可同时提取 RNA、代谢物和脂质；操作简单，适合小样本和珍贵样本	需要控制样本量，操作时易发生污染；RNA降解或不纯可能影响结果	用于小样本量分析，适合临床样本和特殊组织
改良Folch提取方法	通过氯仿-甲醇溶剂系统分配代谢物，并结合商业试剂盒（如 QIAGEN All-Prep）同时提取其他分子	小体积组织样本（如30 mg）	代谢物、RNA、DNA、蛋白质	氯仿：甲醇（2：1），水（含EDTA）、氯仿：甲醇（10：1）	提取效率高，能从小样本中高效提取多种分子；适合多组学分析，支持高通量	成本较高，依赖商业试剂盒，样本量要求较高；需要严格控制分层，避免交叉污染	用于小样本、多组学联合分析，已在小鼠肝脏、肿瘤等样本中验证

同时提取的技术不仅提升了研究的高效性，还为科学探索提供了多维度的视角，推动了生物学特别是系统生物学的发展。随着技术的不断进步，这一方法在未来的生物医学研究中必将发挥更大的作用。

2 同时提取技术的研究现状

2.1 甲醇/氯仿萃取法

1959年，Bligh和Dyer^[16]在*Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*杂志上发表了一篇题为“A rapid method of total lipid extraction and purification”的论文，提出了使用氯仿-甲醇-水体系提取生物样品中脂质的经典方法，即Bligh-Dyer法。20世纪80年代，为提高提取效率，尤其是针对一些难以提取的脂质成分，在提取微生物膜脂时，有研究将提取液中的磷酸缓冲液替换为三氯乙酸，并对提取过的样品残渣进行再次提取，从而能更全面地回收样品中的脂质。20世纪90年代至21世纪初，在分析植物组织中的脂质时，为避免植物中的脂酶对脂质造成降解，影响提取的准确性和完整性，引入了加热法使脂酶失活，进而更好地保护脂质，提高提取质量。2010年以后，随着超声萃取、微波辅助提取等新技术的应用，Bligh-Dyer法也不断与这些技术结合，例如，超声萃取可以增加溶剂的渗透性和提取效率，微波辅助提取则可以利

用微波的热效应和非热效应加速脂质的溶出，进一步提高了Bligh-Dyer法的提取效率和适用范围。该方法基于相似相溶原理和双相溶剂系统，利用不同物质在有机相和水相中的溶解度差异进行分离，为后续甲醇/氯仿萃取法的发展奠定了基础，这是最开始的甲醇/氯仿萃取法。Folch等^[17]在Bligh-Dyer法的基础上进行了改进，提出了Folch法，即使用氯仿-甲醇-水（8：4：3， $v:v:v$ ）混合溶剂对生物样品进行全脂提取。这两种方法都利用了氯仿和甲醇的混合体系，能够在多种复杂基质中非选择性地提取出各种脂质分子，水相的加入可以增强相分离，减小脂质在水相中的溶解度，从而提高萃取效率。一直到现在，科学家们通过添加甲醇和氯仿的混合物，使代谢物和核酸分离到不同的相中，代谢物通常在有机相中，而核酸则留在水相中。该方法操作简单，成本低，适用于多种生物样本。例如，在Vorreiter等^[5]提出的优化协议中，通过在分离DNA/RNA和蛋白质之前添加甲醇/氯仿代谢物纯化步骤，实现了DNA、RNA、蛋白质和代谢物的同时提取。在Woodward等^[18]的研究中，描述了4种双重提取方法，旨在优化同时从同一样本中提取代谢物/脂质和RNA。与常规的RNA提取方法（如mirVana Kit）和代谢物提取方法（如溶剂添加法）相比，这4种提取方法的效果进行了评估和比较。具体包括以下4种提取方法：a. Cryomill/mirVana

(甲醇:水:氯仿比为1:1:2)^[19]; b. Cryomill-wash/Econospin (甲醇:水:氯仿比为5:1:2)^[20]; c. Rotation/phenol-chloroform (甲醇:水:氯仿比为9:10:1)^[13]; d. Sequential/mirVana (甲醇:水:氯仿比为1:1:3)^[18]。

这些方法的比较结果表明,所有方法都能提取相同的代谢物,但有些方法在脂质提取上有所不同。Cryomill/mirVana 和 Sequential/mirVana 方法提取的RNA量最高,分别为单独使用mirVana Kit提取RNA量的70%和68%^[18]。Rotation/phenol-chloroform方法虽然提取代谢物效果好,但无法有效提取脂质。Sequential/mirVana方法被认为是最有效的提取方法^[18],它结合了代谢物/脂质的溶剂提取法和mirVana RNA提取法,能够在同一样本中提取所有目标分子,并具有较高的效率^[20-22]。通过表3的对比,研究人员可以根据自己的实验需求和样本类型,选择最适合的双重提取方法。例如,对

于需要高纯度RNA提取的研究,Rotation/phenol-chloroform方法可能是最佳选择;而对于需要同时提取多种生物分子的研究,Sequential/mirVana方法可能更为合适。表3不仅展示了每种方法的具体步骤和优势,还提供了适用样品类型的建议,帮助研究人员在实际操作中做出更合理的决策,同时也为科研工作者呈现了一份详尽的参考指南,依据各自的研究目的与实验情境,精准挑选契合的双重提取方案,进而优化实验流程,确保实验成果的精准度与可信度。

研究发现,通过sequential/mirVana方法,研究人员能够在BXD-1425细胞中识别出64种不同丰度的代谢物和28个差异表达的代谢基因,并发现了4个基因-代谢物的相互作用。同时,在原发性室管膜瘤组织中,所有代谢物和62%的脂类都在检测限以上,RNA的产量也足够用于转录组学研究,证明了该方法的有效性和实用性。

Table 3 Characteristics and advantages and disadvantages of four methanol/chloroform dual extraction methods
表3 四种甲醇/氯仿萃取双重提取方法的特点与优缺点

提取方法	特点与步骤	步骤描述	优势	适用样品
Cryomill/ mirVana ^[19]	a. 冷冻研磨样品以均质化	将样品在液氮中冷冻并研磨。加入	高效均质化,适合提取	适用于RNA和脂类 提取的样本
	b. 使用mirVana试剂提取RNA	mirVana试剂提取RNA	RNA及脂类	
Cryomill-wash/ Econospin ^[20]	a. 冷冻研磨后进行洗涤和分离	使用Cryomill冷冻研磨样品。采用	提高样品纯度,适合大	适合细胞和组织 样本
	b. 结合Econospin方法提取	Econospin技术进行洗涤和分离	规模处理	
Rotation/Phenol- Chloroform ^[13]	a. 通过旋转洗涤样品	将样品与酚-氯仿混合,旋转后离心分	提取高纯度RNA,分离	适用于RNA及其他 代谢物
	b. 使用酚-氯仿进行相分离	相。收集上层水相以提取RNA	效果良好	
Sequential/ mirVana ^[18]	a. 顺序提取方法,优化RNA和	采用mirVana试剂进行逐步提取。通过洗	高度专一性,适合同时	适用于RNA和脂类 提取的样本
	脂类分离	涤步骤提高纯度	提取多种分子	
	b. 结合多步洗涤			

双重提取方法具有显著的优势,首先,它极大地提高了提取效率,相较于传统的单一提取方法,不仅能够有效提取代谢物,还能够从同一样本中提取RNA和脂质,从而大幅提升样本的利用效率^[23-25]。其次,该方法支持多组学整合,能够同时提取代谢物、脂质和RNA,为多组学数据的整合提供了可靠的基础,这在揭示基因与代谢物之间的相互作用以及代谢途径方面尤为重要。该方法还展现出高灵敏度,即使在低样本量(如10 mg组织)的情况下,也能获得足够质量的代谢物、脂质和RNA以供后续的定量和分析,适用于临床样本和稀有样本的研究。

Shahwan实验室^[10]使用甲醇:氯仿:水(3:1:1, v:v:v),通过这种方式,从油棕根中提取

的RNA回收率为180.25 μg/g, A_{260}/A_{280} 比值在1.9~2.0之间, RIN 值6.7。共提取的蛋白质导致每100 mg鲜重(fresh weight, FW)组织的回收率为29.28 μg,并在油棕根中共发现1 852种蛋白质。极性代谢物揭示了大约40个代谢物峰,非极性代谢物具有两个主要脂肪酸基团,即饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸,分别为55.4%和38.6%。该方法能够从油棕根部组织中提取RNA,回收量为180.25 μg/g,并且RNA的 A_{260}/A_{280} 比值在1.9~2.0之间,表明RNA的纯度较高,符合下游分析的标准。然而,该方法也面临一些挑战与局限性。尽管RNA提取效果较佳,但对于复杂组织(如肿瘤组织),RNA降解或污染的风险仍然存在^[12],该方法基于相似相溶原理,利用甲醇和氯仿混合液使代谢物与核酸

分离。它操作简单、成本低,适用于多种生物样本,能高效提取代谢物、RNA和蛋白质。然而,它对脂质提取效果欠佳,且提取的RNA质量可能受污染,需要优化溶剂比例以提高脂质提取效果。在肾癌细胞研究中,对于需要全面分析代谢物和核酸相互作用的实验,甲醇/氯仿萃取法可能无法满足对RNA高纯度的要求,从而影响后续的转录组学分析,因此优化提取过程以提高RNA的质量和完整性将是未来研究的一个方向。此外,尽管该方法能够提取大部分脂质,但在某些情况下,可能需要根据不同类型的代谢物或脂质的特性进一步优化提取溶剂体系。这些挑战的解决将为双重提取方法的应用提供更为坚实的基础。

尽管甲醇/氯仿萃取法在成本与通用性上具有明显优势,但要实现其“最优解”,关键不在于单一方法的极致优化,而在于构建模块化、可调整的溶剂体系。未来的整合策略应跳出传统配方的束缚,转而设计动态可调的溶剂梯度系统。例如,可根据目标分子组分的极性差异,在提取过程中分阶段调整甲醇/氯仿/水的比例:先用高甲醇比例(如甲醇:氯仿=3:1)高效萃取极性代谢物,再通过梯度降低甲醇比例(至1:2)选择性富集中等极性分子,最后用低极性混合溶剂回收脂质类组分。这种时序性溶剂梯度萃取的核心优势在于,它不仅解决了传统方法中高代谢物回收率与高RNA质量的矛盾,更为重要的是,它提供了一种普适性的方法,研究人员可根据具体样本特性(如脑组织的高脂质含量或植物组织的多酚干扰)和实验目标,定制专属的溶剂梯度参数。这种从“固定配方”到“动态系统”的范式转变,正是整合传统方法优势、实现适应性最优解的关键路径。进一步地,这种动态系统可与自动化液控平台结合,实现高通量、可编程的智能提取流程,为大规模多组学研究提供标准化且个性化的解决方案。

2.2 TRIzol试剂法

TRIzol试剂是一种含有酚和异硫氰酸胍的裂解试剂,主要应用于DNA、RNA和蛋白质的提取^[26]。Kao等^[27]的研究提出了一种顺序提取方法,目的是同时提取这些生物分子和代谢物、脂质。具体步骤(图2)如下:首先需要准备样本,适用于多种生物样本,如组织、细胞和体液等。样本处理时,将样本剪碎或研磨,并按1:10的比例加入TRIzol试剂。接着,将样本与TRIzol试剂充分混合,确保细胞完全裂解,此步骤可通过手动研

磨或使用匀浆机完成。在裂解过程中,TRIzol试剂中的异硫氰酸胍会破坏细胞膜,释放细胞内的生物分子。建议在4℃操作,将匀浆后的混合物在4℃下静置15 min,以确保细胞完全裂解,同时抑制核酸酶活性,保护RNA的完整性。随后,加入氯仿进行相分离,按样本量每1 ml TRIzol试剂加入0.2 ml氯仿,盖紧离心管剧烈振荡15 s,然后在室温下静置15 min使混合物分层。在分层过程中,需要注意控制离心速度和时间,以避免交叉污染。将混合物在4℃下以12 000 r/min的速度离心15 min,混合物将分为3层:上层有机相含有脂质和部分代谢物,中层水相含有核酸(DNA和RNA),下层沉淀相则含有蛋白质。在提取代谢物和脂质时,从上层有机相中提取代谢物,通常使用甲醇(MeOH)或甲基叔丁基醚(MTBE)作为提取溶剂,通过有机相萃取法进一步富集代谢物。脂质主要存在于上层有机相中,可以通过直接溶解或使用氯仿/甲醇混合液进行提取。而核酸则从中间的水相中提取,通常使用异丙醇或乙醇沉淀核酸,之后通过离心收集核酸沉淀,并用70%乙醇洗涤去除杂质后溶解于无菌水中。

在提取过程中,需要注意以下几点:一是样本量控制,以确保裂解和分离效果,建议每次处理的样本量不超过100 mg组织或 1×10^6 个细胞;二是操作时需低温条件下进行,以尽量缩短处理时间,减少生物分子的降解;三是提取的核酸、代谢物和脂质需要通过分光光度计、液相色谱-质谱联用技术等方法进行纯度和浓度检测。这一过程称为顺序提取(sequential isolation),即在TRIzol的提取过程中先提取RNA、DNA和蛋白质后,脂质和代谢物被有效地释放在液相中^[27]。研究表明,TRIzol提取的代谢物在上清液中表现出与传统甲醇提取方法相似的代谢物谱。通过比较TRI-P层和甲醇提取液中的代谢物,研究人员发现两者之间代谢物种类高度重合,且差异显著。例如,研究人员在TRI-P层和甲醇提取液中均检测到了多种氨基酸,如丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、谷氨酸、精氨酸和瓜氨酸等。

近年来的研究表明,TRIzol试剂同样可以用于代谢物和脂质的提取,从而实现从单个样本中同时提取多种生物分子(如核酸、代谢物和脂质)。Kao等^[27]为了提高代谢物和脂质的提取效率,发现可以在TRIzol裂解后加入氯仿(400 μ l/1 ml TRIzol),以增强有机相的分离效果。此外,对于

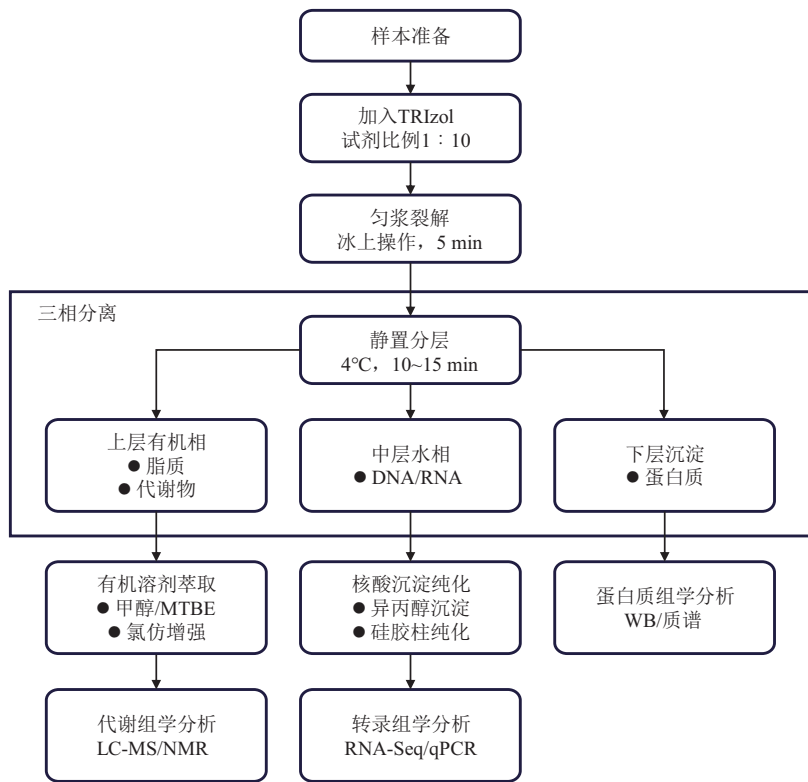


Fig. 2 Steps of the TRIzol reagent method

图2 TRIzol试剂法步骤

本图展示了TRIzol试剂法的提取流程图，包括细胞裂解、相分离、核酸和蛋白质提取等步骤。TRIzol试剂利用酚和异硫氰酸胍裂解细胞，并通过氯仿分相，能够同时从同一样本中提取RNA、代谢物和脂质。MTBE：甲基叔丁基醚（methyl tert-butyl ether）；LC-MS：液相色谱-质谱联用（liquid chromatography-mass spectrometry）；NMR：核磁共振（nuclear magnetic resonance）；RNA-Seq：RNA测序（RNA sequencing）；qPCR：实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR）；WB：蛋白质印迹法（Western blot）。

脂质提取，可以使用氯仿：甲醇（2：1，v：v）混合液进行二次提取。在核酸提取过程中，使用RNase或DNase处理可以去除不需要的核酸类型，进而提高核酸的纯度，使用硅基质柱（如Qiagen的RNeasy或DNAeasy柱（Qiagen公司））进行纯化则是另一种有效的提升纯度的方法。使用TRIzol试剂的优势在于能够从单个样本中同时提取核酸、代谢物和脂质，为多组学研究提供便利。例如，Kao等^[27]在对幽门螺杆菌的研究中，通过TRIzol试剂提取的代谢物和脂质与传统提取方法（如MeOH和MTBE）所获得的结果一致，验证了TRIzol试剂的可行性。此外，对于珍贵或稀有样本（如临床样本或特殊组织），TRIzol试剂的多分子提取能力能够显著节省样本用量，且其操作流程相对简单，适合实验室常规使用。在使用TRIzol试剂时，操作时需要注意样本量控制，以确保裂解和分离效果，同时需关注代谢物和脂质的稳定性，建议

在低温条件下操作并尽量缩短处理时间。提取的核酸、代谢物和脂质需要通过分光光度计、液相色谱-质谱联用技术等方法进行纯度和浓度检测^[22]。

TRIzol试剂作为一种经典的生物样本制备试剂，不仅能够高效提取核酸，还可以通过优化步骤同时提取代谢物和脂质^[28-30]。该方法使用含酚和异硫氰酸胍的TRIzol试剂裂解细胞，并通过氯仿分相分离生物分子。该方法可以同时提取RNA、代谢物和脂质，操作简便，适合小样本和珍贵样本。但在操作过程中易发生污染，且对样本量有要求，RNA降解或不纯可能影响结果。在肾癌细胞研究中，对于一些微量的珍贵肾癌组织样本，TRIzol试剂法是一个可选方案，但需要严格控制操作条件，以保证RNA的完整性和纯度。这种方法为多组学研究提供了一种高效、经济的解决方案，特别适用于珍贵样本的分析。

TRIzol试剂法未来的发展趋势不在于追求更高

效的商业试剂，而在于解构其成功逻辑并重构为标准化、可拓展的模块化流程。传统 TRIzol 法的核心局限在于研究人员难以针对特定需求调整裂解、相分离和沉淀条件。未来的整合策略应从以下 3 个维度重构该方法。首先，解耦与重组。将 TRIzol 试剂的 3 个核心功能——强力裂解（异硫氰酸胍）、相分离驱动（酚-氯仿）和核酸保护，拆分为独立模块，允许根据样本类型（如难裂解的革兰氏阳性菌或易降解的临床样本）选择合适的模块组合。其次，相分离过程的精准控制。传统方法依赖经验性的离心和移液操作，这引入了显著的变异。通过引入微流控相分离芯片，可在纳升尺度精确控制界面形成和分离，不仅能将样本损失降至皮升水平，还能实现多层界面的选择性分离（如同时分离极性与非极性代谢物、大小 RNA）。最后，沉淀步骤的替

代方案。核酸的醇沉淀步骤是耗时和损失的主要环节，将其替换为表面功能化磁珠选择性捕获（如分别用不同修饰的磁珠捕获 DNA 和 RNA），不仅能大幅缩短时间，还能实现自动化操作。这种“解构-重构”的整合策略，将 TRIzol 法从一种“配方”提升为一种可定制、自动化、低损失的平台化方法体系，从而在不同应用场景中都能实现接近理论最优的提取效率和质量。

2.3 改良 Folch 法

传统的 Folch 方法主要用于脂质的提取，通过使用氯仿和甲醇的混合溶剂体系，实现极性和非极性代谢物的分离。Hasegawa 等^[4]提出了一种优化的 Folch 提取方法，用于从单份小体积组织样本中同时提取极性代谢物（如 oxylipins）、非极性代谢物、DNA、RNA、小 RNA 和蛋白质。

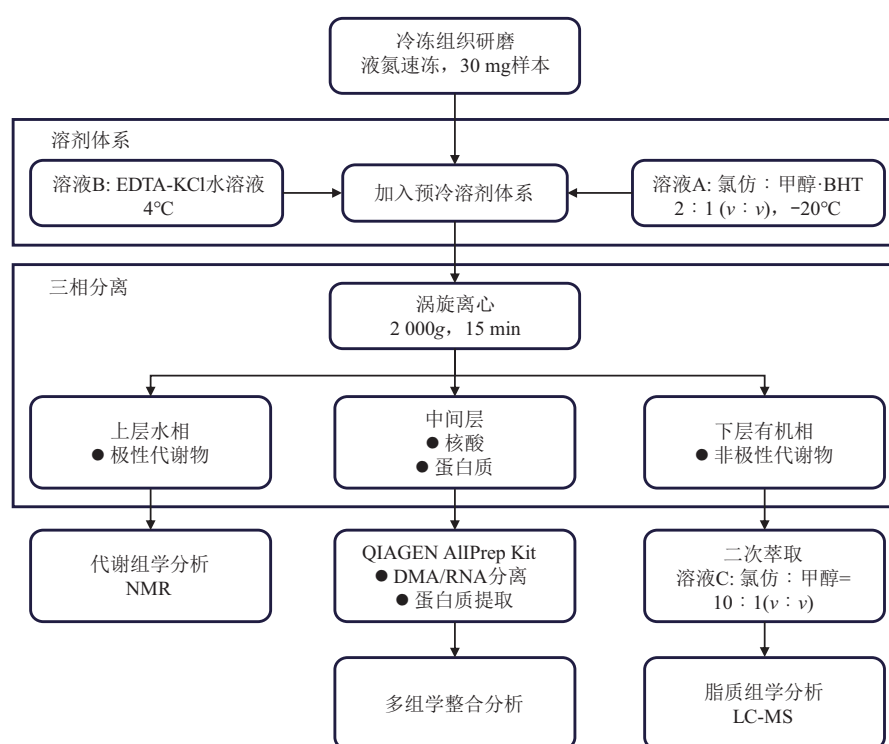


Fig. 3 Modified Folch method

图3 改良Folch法

本图展示了改良Folch提取法的流程图，结合了氯仿-甲醇溶剂体系与商业试剂盒，能够同时提取代谢物、RNA、DNA和蛋白质。此方法通过精确的分层操作和溶剂体系优化，提高了提取效率，尤其适用于小样本的多组学分析。EDTA：乙二胺四乙酸（ethylenediaminetetraacetic acid）；BHT：2,6-二叔丁基对甲酚（butylated hydroxytoluene）；NMR：核磁共振（nuclear magnetic resonance）；LC-MS：液相色谱-质谱联用（liquid chromatography-mass spectrometry）；QIAGEN AllPrep Kit：QIAGEN公司AllPrep DNA/RNA/Protein Mini试剂盒（用于同时纯化DNA、RNA和蛋白质）。

该方法结合了传统Folch液液萃取法的改进版本与商业试剂盒（如QIAGEN AllPrep DNA/RNA/

Protein Mini Kit（QIAGEN公司）），以解决多组学研究中样本量不足和异质性问题。传统Folch法

是一种经典的脂质提取方法, 基于氯仿-甲醇-水的两相溶剂体系 (体积比通常为 8 : 4 : 3), 通过离心分层分离极性 (水相) 和非极性 (有机相) 代谢物。该方法的优势在于能高效分离不同极性的生物分子, 但通常仅用于脂质或代谢物的单独提取^[31-34]。改良的 Folch 法, 在传统 Folch 法的基础上进行了改进与优化, 以实现多组分的同时提取 (图 3)。

首先, 溶剂配方进行了调整, 其中溶液 A 是氯仿与甲醇 (2 : 1) 的混合液, 含有 0.002% BHT (抗氧化剂), 并预冷至 -20°C, 用于初始组织裂解和脂质提取, BHT 作为一种常见的抗氧化剂, 其添加目的是防止脂质在提取过程中发生氧化反应。脂质氧化不仅会导致目标脂质的损失, 还会产生一些氧化产物, 对后续的分析造成干扰, 影响脂质的纯度和数据的准确性。BHT 能够有效捕捉氧化反应中的自由基, 从而抑制氧化链式反应的进行, 保护脂质的完整性。溶液 B 为含有 1 mmol/L EDTA 和 0.9% KCl 的超纯水溶液, 预冷至 4°C, 旨在稳定代谢物并促进相分离。EDTA 是一种金属离子螯合剂, 可以与溶液中可能存在的金属离子 (如 Fe³⁺、Cu²⁺ 等) 结合, 形成稳定的络合物。这些金属离子有时会催化一些氧化或水解反应, 对代谢物的稳定性产生不利影响。此外, EDTA 的存在还可以减少因金属离子与生物分子 (如核酸、蛋白质等) 发生非特异性结合而引起的沉淀或聚集现象, 有助于保持代谢物的溶解性和完整性, 从而提高提取效率和质量。溶液 C 则是氯仿与甲醇 (10 : 1) 的混合液, 用于二次萃取残留的非极性代谢物。这种溶剂比例的调整是为了更高效地提取非极性代谢物, 确保在初次萃取后仍有较多残留的非极性代谢物能够被充分提取出来, 从而提高非极性代谢物的回收率。

其次, 分步提取流程中, 将组织样本置于液氮环境中进行冷冻研磨。液氮的低温可以迅速使组织细胞冻结, 降低细胞内酶的活性, 减少因酶促反应对生物分子造成的降解。同时, 冷冻后的组织在研磨过程中更容易被破碎, 使细胞内的生物分子能够充分释放出来。研磨时需控制研磨力度和时间, 一般采用适量的压力进行研磨, 时间控制在数分钟内, 以确保组织充分破碎又避免过度产热。过度研磨可能会导致样本局部温度升高, 影响生物分子的稳定性^[35]。初次萃取时, 将溶液 A 和 B 按一定比例加入研磨后的组织粉末中, 随后进行涡旋混合, 使溶液与组织充分接触, 促进生物分子的溶出。涡

旋混合时要保证速度均匀, 避免产生过多泡沫, 以免影响后续离心分层的效果。接着进行离心操作, 离心速度和时间需根据样本类型和实验需求进行优化, 一般在 2 000~3 000g 下离心 10~15 min, 分离出下层 (非极性相) 和上层 (极性相), 并保留中间层以备后续的核酸和蛋白质提取。而在二次萃取过程中, 对残留的中上层添加溶液 C, 再次进行涡旋混合, 以进一步分离非极性代谢物。这一过程是为了提高非极性代谢物的回收率, 确保尽可能多地提取出样本中的非极性代谢物。涡旋混合后同样需要进行离心操作, 条件与初次离心相似, 使溶液 C 中的非极性代谢物充分分离出来。中间层的处理则采用 QIAGEN AllPrep 试剂盒 (QIAGEN 公司) 进行细胞裂解^[36], 以同时提取 DNA、RNA、小 RNA 和蛋白质, 并结合 RNase-Free DNase (QIAGEN 公司) 与 RNeasy MinElute (QIAGEN 公司) 技术进行核酸的纯化。该研究建立的改良 Folch 同时提取法可从 30 mg 组织样本中同时获得: a. 代谢组部分——通过 ¹H NMR 定量分析 43 种极性代谢物 (含抗坏血酸等关键分子), LC-MS/MS 检测 72 种非极性氧脂素, 方法 C 提取的代谢物 CV 显著低于传统方法; b. 核酸部分——Qubit 定量显示可获得完整基因组 DNA (凝胶电泳验证分子质量 > 10 kb) 和高纯度 RNA (Bioanalyzer (Agilent 公司) 确认 18S/28S rRNA 完整性), 并实现小 RNA 特异性富集。通过对比三种提取方案, 验证了方法 C 在代谢物回收率 ($P < 0.01$)、核酸完整性及实验重现性上的综合优势, 成功解决了小样本多组学分析中组织异质性干扰的关键问题。此外, 为了确保提取的质量, 采用核磁共振 (NMR) 和质谱 (LC-MS/MS) 验证极性和非极性代谢物的完整性与浓度, 核酸和蛋白质则通过 NanoDrop 2000c 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific 公司) 和 Qubit Fluorometer 荧光计 (Thermo Fisher Scientific 公司) 进行定量^[37], 并利用 Bioanalyzer (Agilent 公司) 评估 RNA 的完整性 (RIN 值)^[38]。经研究证明, 使用商业试剂盒提取的 DNA 和 RNA 纯度高 ($A_{260} : A_{280}$ 比值在 1.8~2.0 范围内), 小 RNA 回收量充足, 蛋白质提取量满足后续的蛋白质组学分析需求。

与传统 Folch 法相比, 改良后的 Folch 法不仅目标分子涵盖了代谢物、DNA、RNA 和蛋白质的全组分, 而且在样本量上可以处理较小组织量 (30 mg), 相分离次数增加至两次, 从而提高了非极性代谢物的回收率, 并支持多组学的分析。该方

法具备高通量的优势, 单次可处理 12 个样本, 耗时约 4 h (不包括冻干步骤), 同时减少了因样本分装导致的组分数据偏差^[39]。此外, 已在小鼠肝脏和肿瘤等组织中验证其广泛适用性, 有潜力扩展至其他生物样本^[40]。然而, 该方法也存在一些局限性, 如中间层核酸提取依赖于商业试剂盒, 导致成本较高, 同时极性与非极性代谢物之间可能存在交叉污染的风险, 需要通过严格的分层操作进行控制。关键实验步骤示例包括将 30 mg 冷冻组织粉末与 2.4 ml 溶液 A 混合, 涡旋后以 2 000g 离心 15 min, 随后收集下层有机相 (非极性代谢物), 而上层水相则经过二次萃取后合并, 最终在溶液 C 中间层中加入含 2-巯基乙醇的裂解缓冲液 (Buffer RLT), 通过 QIAshredder 柱 (QIAGEN 公司生产的分离柱) 进行裂解液的纯化, 以分馏出 DNA、RNA 和蛋白质。改良的 Folch 法通过优化溶剂体系、整合多组学提取流程, 实现了小样本中多类生物分子的高效同时提取^[41-42]。改良 Folch 法通过氯仿-甲醇溶剂系统分离代谢物, 并结合商业试剂盒同时提取其他分子。它提取效率高, 能从小样本中高效提取多种分子, 适合多组学分析和高通量研究。不过, 该方法成本较高, 依赖商业试剂盒, 样本量要求也相对较高, 且需要严格控制分层以避免交叉污染。在肾癌细胞的多组学研究中, 改良 Folch 法能够很好地满足从有限的肾癌细胞样本中同时提取多种生物分子的需求, 为全面深入地研究肾癌细胞的分子机制提供了有力支持, 但在成本控制方面需要进一步优化。这一方法为多组学联合分析提供了标准化方案, 尤其在临床和珍稀样本研究中具有重要应用价值。

改良 Folch 法的现有形式已接近小样本多组学提取的局部最优, 但要使该方法具有更广泛的适用性, 必须突破其对商业试剂盒的依赖, 发展开放、标准化且可溯源的整合系统。当前方法的限制在于其“闭源”特性——QIAGEN AllPrep 等试剂盒的具体化学组成和结合机制不透明, 限制了方法的深度优化和成本控制。未来的整合方向应是构建开源的多模态分离矩阵, 开发一系列明确化学组成的固相材料 (如不同孔径的硅胶、修饰不同官能团的磁珠、特定亲和配基的树脂), 这些材料可按需组装成序列分离柱。例如, 针对 30 mg 肿瘤组织样本, 可依次通过: a. 大孔径硅胶捕获 DNA 和蛋白质聚集体; b. 氨基修饰磁珠特异性结合 RNA; c. C18 反相材料富集非极性代谢物; d. 亲水作用材料回收极

性代谢物。这种物理分离序列的优势在于每个步骤的机理明确、可独立优化, 且成本可控。更重要的是, 它建立了提取过程与分子特性的直接映射关系, 通过记录每个组分的洗脱条件, 研究人员不仅能获得纯化的分子, 还能推断其理化性质, 这为多组学数据的深度整合提供了前所未有的元数据维度。结合自动化平台和实时质控传感器, 这一开源系统将形成从样本到数据的全链条可追溯、可优化的智能提取生态, 这才是实现未来多组学研究更方便的真正路径。

3 总结与展望

随着多组学研究的深入发展, 同时提取代谢物与核酸的技术已成为生物样本前处理的关键环节。本文系统综述了甲醇/氯仿萃取法、TRIzol 试剂法及改良 Folch 法等主流同时提取策略, 分析了其原理、优势与局限性, 并探讨了其在临床医学、植物科学、微生物生态等领域的实际应用。同时提取技术通过整合提取流程, 显著提高了样本利用效率, 减少了因多次处理引起的降解与污染, 确保了多组学数据的一致性与可比性^[43-45]。例如: 在临床肿瘤研究中, 利用 Sequential/mirVana 方法可从同一组织块中同步获取代谢物、脂质与 RNA, 支撑转录组与代谢组的联合分析, 揭示基因-代谢物互作网络; 在植物系统生物学中, 改良 Folch 法成功应用于油棕根部组织, 同时提取 RNA、蛋白质及极性/非极性代谢物, 为作物代谢调控研究提供全面数据支持^[46-48]; 在环境微生物学中, 结合磁珠法的自动化提取平台实现了土壤样本中 DNA、RNA 与代谢物的高通量提取, 助力微生物群落功能与代谢活动的研究^[49]。不同同时提取方法的性能与特点、适用样本类型的具体内容如表 4 所示。

展望未来, 同时提取技术虽已在多组学研究中展现出显著优势, 但仍面临代谢物稳定性不足、提取纯度波动、标准化体系缺失以及成本控制等多重挑战。为进一步提升其效率、通用性与实用性, 应在多个方向持续发力。技术融合与创新是核心路径之一, 例如将微流控芯片与磁珠纯化系统结合, 构建一体化、低降解的提取平台, 实现对单细胞或微量样本的高精度处理; 自动化与高通量技术的引入, 不仅能够大幅提高样本通量和操作重现性, 还可减少人为误差, 为大规模临床队列研究提供技术支持^[50]。标准化是推动技术广泛应用的关键, 需建立针对不同来源样本 (如组织、血液、微生物)

Table 4 Performance comparison of different extraction methods and applicable sample types

表4 不同提取方法的性能比较及适用样本类型

方法	提取效率	纯度	成本	适用样本类型	可同时提取的组分	相关文献
甲醇/氯仿萃取法	中	中	低	组织、细胞	代谢物、RNA、蛋白质	[5, 16-20]
TRIzol试剂法	高	低	高	组织、细胞、体液	代谢物、脂质、RNA、蛋白质、DNA*	[26-28, 30]
改良Folch法	高	高	高	组织(小样本)、细胞	极性/非极性代谢物、DNA、RNA、蛋白质	[4, 31-35]

*DNA提取通常需在RNA提取后, 从中间相或沉淀中另行分离。

的标准操作程序 (standard operating procedure, SOP), 并促进商业试剂盒的开放化和模块化, 降低对单一供应商的依赖。

在应用层面, 同时提取技术有望在精准医疗中发挥更大作用, 例如用于液体活检中循环核酸与代谢物的共提取, 以揭示肿瘤异质性和治疗反应机制。在环境微生物学和农业系统生物学中, 该技术也可用于土壤、植物-微生物相互作用等复杂体系的多组学联合解析, 推动生态调控和作物育种的发展。质量控制的智能化是另一重要趋势, 通过引入实时传感器、荧光示踪等动态监测手段, 可评估提取过程中分子完整性; 结合机器学习算法对提取参数进行预测与优化, 能够为特定样本类型量身定制提取方案, 实现精准化与前处理流程的系统优化。通过跨学科协作、技术整合与流程标准化, 同时提取技术将逐步迈向更高效、稳定、经济的新阶段, 为多组学深度融合与临床转化研究提供坚实支撑。

参 考 文 献

[1] 霍志远, 周金萍, 马秀敏, 等. 基于质谱的单细胞多组学分析技术研究进展. 高等学校化学学报, 2024, **45**(11): 16-27
Huo Z Y, Zhou J P, Ma X M, *et al.* Chem J Chin Univ, 2024, **45**(11): 16-27

[2] Cafiso A, Chiappa G, Luzzago C, *et al.* Protocol optimization for simultaneous DNA and RNA co-extraction from single hard tick specimens. MethodsX, 2021, **8**: 101315

[3] Henne A, Vigh A, Mårtens A, *et al.* SiMeEx, a simplified method for metabolite extraction of adherent mammalian cells. Front Mol Biosci, 2022, **9**: 1084060

[4] Hasegawa Y, Otoki Y, McClorry S, *et al.* Optimization of a method for the simultaneous extraction of polar and non-polar oxylipin metabolites, DNA, RNA, small RNA, and protein from a single small tissue sample. Methods Protoc, 2020, **3**(3): 61

[5] Vorreiter F, Richter S, Peter M, *et al.* Comparison and optimization of methods for the simultaneous extraction of DNA, RNA, proteins, and metabolites. Anal Biochem, 2016, **508**: 25-33

[6] 谢井盛, 叶子璐. 基于质谱技术的单细胞蛋白质组学. 生物化学与生物物理进展, 2024, **51**(10): 2705-2716
Xie J S, Ye Z L. Prog Biochem Biophys, 2024, **51**(10): 2705-2716

[7] Fierer N, Leung P M, Lappan R, *et al.* Guidelines for preventing and reporting contamination in low-biomass microbiome studies.

Nat Microbiol, 2025, **10**(7): 1570-1580

[8] 胡笛, 赵密, 李春宇, 等. 适用于现场即时检测的核酸快速提取新方法. 中国食品学报, 2025, **25**(8): 471-485
Hu D, Zhao M, Li C Y, *et al.* J Chin Inst Food Sci Technol, 2025, **25**(8): 471-485

[9] Gegner H M, Naake T, Aljakouch K, *et al.* A single-sample workflow for joint metabolomic and proteomic analysis of clinical specimens. Clin Proteomics, 2024, **21**(1): 49

[10] Shahwan S. All-in-one comprehensive extraction of metabolites, proteins and ribonucleic acid for the rapid analysis of oil palm systems biology. J Oil Palm Res, 2021, **34**(2): 234-247

[11] Yin J, Suo Y, Zou Z, *et al.* Integrated microfluidic systems with sample preparation and nucleic acid amplification. Lab Chip, 2019, **19**(17): 2769-2785

[12] 喻春函, 宋辉, 曹文刚, 等. 双磁珠法质粒DNA提取技术及应用. 生物工程学报, 2023, **39**(11): 4708-4717
Yu C H, Song H, Cao W G, *et al.* Chin J Biotechnol, 2023, **39**(11): 4708-4717

[13] 艾永建, 何梦崎, 梁琼麟. 基于微流控技术的药物分析新进展. 药物分析杂志, 2023, **43**(10): 1631-1644
Ai Y J, He M Q, Liang Q L. Chin J Pharm Anal, 2023, **43**(10): 1631-1644

[14] Lee D Y, Kind T, Yoon Y R, *et al.* Comparative evaluation of extraction methods for simultaneous mass-spectrometric analysis of complex lipids and primary metabolites from human blood plasma. Anal Bioanal Chem, 2014, **406**(28): 7275-7286

[15] Tyagi R K, Azrad A, Degani H, *et al.* Simultaneous extraction of cellular lipids and water-soluble metabolites: evaluation by NMR spectroscopy. Magn Reson Med, 1996, **35**(2): 194-200

[16] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol, 1959, **37**(8): 911-917

[17] Folch J, Lees M, Stanley G H S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem, 1957, **226**(1): 497-509

[18] Woodward A, Pandele A, Abdelrazig S, *et al.* Integrated metabolomics and transcriptomics using an optimised dual extraction process to study human brain cancer cells and tissues. Metabolites, 2021, **11**(4): 240

[19] Guo Y, Bosompem A, Zhong X, *et al.* A comparison of microRNA sequencing reproducibility and noise reduction using mirVana and TRIzol isolation methods. Int J Comput Biol Drug Des, 2014, **7**(2/3): 102-112

[20] Valledor L, Escandón M, Meijón M, *et al.* A universal protocol for the combined isolation of metabolites, DNA, long RNAs, small RNAs, and proteins from plants and microorganisms. Plant J,

- 2014, **79**(1): 173-180
- [21] Luo Y, Geng N, Zhang B, *et al.* Effects of harvesting and extraction methods on metabolite recovery from adherently growing mammalian cells. *Anal Methods*, 2020, **12**(19): 2491-2498
- [22] Johnson C H, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, **17**(7): 451-459
- [23] Eylem C C, Nemutlu E, Dogan A, *et al.* High-Throughput Single-Step plasma sample extraction optimization strategies with experimental design for LC-MS and GC-MS integrated metabolomics and lipidomics analysis. *Microchem J*, 2022, **179**: 107525
- [24] 陈紫薇, 张吉龙, 庄武超, 等. Trizol法提取鸡肝组织总RNA及miRNA的条件优化研究. *中国家禽*, 2024, **46**(9): 175-181
Chen Z W, Zhang J L, Zhuang W C, *et al.* *China Poult*, 2024, **46**(9): 175-181
- [25] Lee J T Y, Tsang W H, Chow K L. Simple modifications to standard TRIzol® protocol allow high-yield RNA extraction from cells on resorbable materials. *J Biomater Nanobiotechnol*, 2011, **2**(1): 41-48
- [26] Pahlevan Kakhki M. TRIzol-based RNA extraction: a reliable method for gene expression studies. *J Sci Islam Repub Iran*, 2014, **25**(1): 13-17
- [27] Kao C Y, Chang C T, Kuo P Y, *et al.* Sequential isolation of metabolites and lipids from a single sample to achieve multiomics by using TRIzol reagent. *Talanta*, 2023, **258**: 124416
- [28] Chang C T, Chiang C K, Chen K Y, *et al.* Development of a novel TRIzol-like reagent for sequential extraction of biomolecules to facilitate multiomics studies. *Microchem J*, 2025, **215**: 114371
- [29] Likhite N, Warawdekar U M. A unique method for isolation and solubilization of proteins after extraction of RNA from tumor tissue using trizol. *J Biomol Tech*, 2011, **22**(1): 37-44
- [30] Leuthold P, Schwab M, Hofmann U, *et al.* Simultaneous extraction of RNA and metabolites from single kidney tissue specimens for combined transcriptomic and metabolomic profiling. *J Proteome Res*, 2018, **17**(9): 3039-3049
- [31] Saini R K, Prasad P, Shang X, *et al.* Advances in lipid extraction methods-a review. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(24): 13643
- [32] Ulmer C Z, Jones C M, Yost R A, *et al.* Optimization of Folch, Bligh-Dyer, and Matyash sample-to-extraction solvent ratios for human plasma-based lipidomics studies. *Anal Chim Acta*, 2018, **1037**: 351-357
- [33] Sostare J, Di Guida R, Kirwan J, *et al.* Comparison of modified Matyash method to conventional solvent systems for polar metabolite and lipid extractions. *Anal Chim Acta*, 2018, **1037**: 301-315
- [34] Salem M, Bernach M, Bajdzienko K, *et al.* A simple fractionated extraction method for the comprehensive analysis of metabolites, lipids, and proteins from a single sample. *J Vis Exp*, **2017**(124): 55802
- [35] Mok J H, Joo M, Cho S, *et al.* Optimizing MS-based multi-omics: comparative analysis of protein, metabolite, and lipid extraction techniques. *Metabolites*, 2024, **14**(1): 34
- [36] Ras A, Helm S, Kelly K, *et al.* Simultaneous isolation of genomic DNA and total RNA using the Qiagen AllPrep® method. *Cancer Res*, 2016, **76**(14_Supplement): 3634
- [37] Omar A M, Zhang Q. Evaluation of lipid extraction protocols for untargeted analysis of mouse tissue lipidome. *Metabolites*, 2023, **13**(9): 1002
- [38] Kiewe P, Gueller S, Komor M, *et al.* Prediction of qualitative outcome of oligonucleotide microarray hybridization by measurement of RNA integrity using the 2100 Bioanalyzer capillary electrophoresis system. *Ann Hematol*, 2009, **88**(12): 1177-1183
- [39] Varaprath S, Salyers K L, Plotzke K P, *et al.* Extraction of octamethylcyclotetrasiloxane and its metabolites from biological matrices. *Anal Biochem*, 1998, **256**(1): 14-22
- [40] Gómez-Brandón M, Lores M, Domínguez J. A new combination of extraction and derivatization methods that reduces the complexity and preparation time in determining phospholipid fatty acids in solid environmental samples. *Bioresour Technol*, 2010, **101**(4): 1348-1354
- [41] Reichl B, Eichelberg N, Freytag M, *et al.* Evaluation and optimization of common lipid extraction methods in cerebrospinal fluid samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, **1153**: 122271
- [42] Kasahara T, Miyazaki T, Nitta H, *et al.* Evaluation of methods for duration of preservation of RNA quality in rat liver used for transcriptome analysis. *J Toxicol Sci*, 2006, **31**(5): 509-519
- [43] Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia T V, *et al.* Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J Lipid Res*, 2008, **49**(5): 1137-1146
- [44] Xiong J, Yang Q, Kang J, *et al.* Simultaneous isolation of DNA, RNA, and protein from *Medicago truncatula* L. *Electrophoresis*, 2011, **32**(2): 321-330
- [45] Boggi B, Sharpen J D A, Taylor G, *et al.* A novel integrated extraction protocol for multi-omic studies in heavily degraded samples. *Sci Rep*, 2024, **14**(1): 17477
- [46] Lim N Y, Roco C A, Frostegård Å. Transparent DNA/RNA co-extraction workflow protocol suitable for inhibitor-rich environmental samples that focuses on complete DNA removal for transcriptomic analyses. *Front Microbiol*, 2016, **7**: 1588
- [47] John Martin J J, Song Y, Hou M, *et al.* Multi-omics approaches in oil palm research: a comprehensive review of metabolomics, proteomics, and transcriptomics based on low-temperature stress. *Int J Mol Sci*, 2024, **25**(14): 7695
- [48] Sapcaru S C, Kanashova T, Weindl D, *et al.* Simultaneous extraction of proteins and metabolites from cells in culture. *MethodsX*, 2014, **1**: 74-80
- [49] Shi J, Zhao J, Zhang Y, *et al.* Windows scanning multiomics: integrated metabolomics and proteomics. *Anal Chem*, 2023, **95**(51): 18793-18802
- [50] Lim S Y, Ng B H, Vermulapalli D, *et al.* Simultaneous polar metabolite and N-glycan extraction workflow for joint-omics analysis: a synergistic approach for novel insights into diseases. *J Proteome Res*, 2022, **21**(3): 643-653

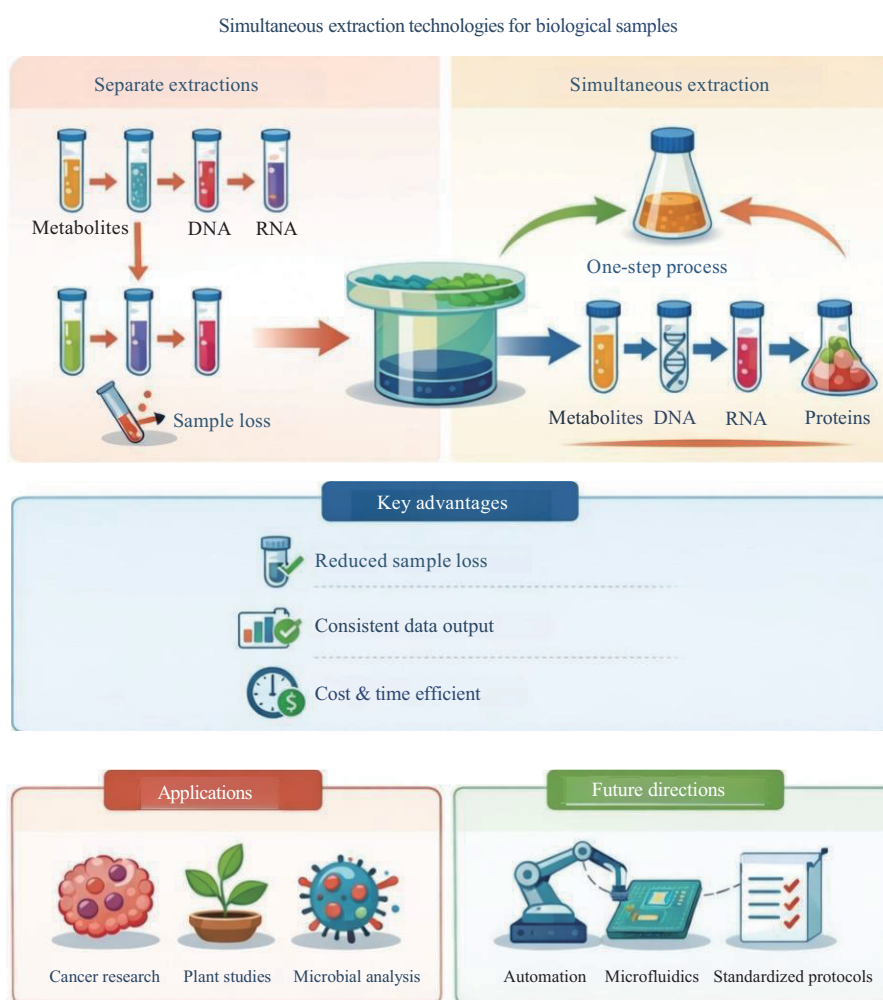
Application and Prospects of Simultaneous Multicomponent Extraction Technology in Biological Samples*

ZHANG Kun-Peng¹⁾, YE Zi-Hong^{1)**}, XUE Zhi-Chao^{2)**}

⁽¹⁾*School of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China;*

⁽²⁾*National Institute of Metrology, Beijing 100029, China)*

Graphical abstract



* This work was supported by grants from Zhejiang Provincial "Spearhead and Leading Goose+X" Science and Technology Program (2025C02125), the National Key Research and Development Program of China (2021YFF0600800), and Fundamental Research Funds for the National Institute of Metrology, China (AKYCX2516).

** Corresponding author.

YE Zi-Hong. Tel: 86-13656686088, E-mail: zhye@cjl.edu.cn

XUE Zhi-Chao. Tel: 86-18612081916, E-mail: xuezc@nim.ac.cn

Received: October 28, 2025 Accepted: April 2, 2026

Abstract With the rapid development of the biopharmaceutical field, the efficient and simultaneous extraction of multiple biological components from biological samples has become a critical process for advancing scientific research. The ability to simultaneously extract various molecular components such as metabolites, DNA, RNA, and proteins is pivotal for multi-omics studies, which aim to comprehensively understand the molecular mechanisms of biological systems. Traditional methods often extract these components separately, leading to challenges such as sample loss, time consumption, contamination, and inconsistencies across different data types. In contrast, simultaneous extraction techniques address these issues by maintaining the consistency of each biological component's physiological state, improving data reliability and facilitating integration across omic platforms. This review systematically summarizes recent advances in simultaneous extraction technologies, focusing on methods such as methanol/chloroform extraction, TRIzol reagent extraction, and modified Folch extraction, which have shown significant promise in improving the efficiency and integrity of biological sample preparation. These methods offer various advantages, such as reduced sample volume requirements, decreased contamination risk, and enhanced extraction consistency, which are crucial for studies involving small sample sizes or precious clinical specimens. Among these, methanol/chloroform extraction stands out for its simplicity, low cost, and ability to extract a wide range of biological molecules. However, it does face limitations, such as its inefficiency in extracting lipids and potential RNA contamination. On the other hand, the TRIzol reagent method has become a widely adopted technique due to its ability to simultaneously isolate RNA, proteins, and metabolites from the same sample. Despite its effectiveness, the TRIzol method has limitations in RNA quality, especially when handling complex samples or those with high protein content. Modified Folch extraction, which combines liquid-liquid extraction with commercial kits, offers a highly efficient way to extract polar metabolites, lipids, RNA, DNA, and proteins from small tissue samples. This method has proven advantageous in terms of extraction yield, especially for challenging or rare samples, although it requires precise handling to avoid cross-contamination between phases. The integration of automated platforms, microfluidics, and high-throughput systems is another exciting avenue for improving simultaneous extraction. Automation facilitates large-scale, reproducible sample processing with minimal human error, while microfluidics provides high precision in sample handling and enables real-time monitoring of extraction efficiency. These innovations not only enhance the speed and reproducibility of sample preparation but also open new possibilities for single-cell analysis, where sample volumes are often limited, and extraction efficiency is critical. In addition to the technical aspects, the review also highlights the importance of optimizing extraction protocols for specific sample types, such as clinical tissues, plants, and microorganisms. For example, the challenge of extracting multiple components from cancer tissues, where sample degradation and contamination risks are high, can be mitigated by carefully selecting extraction reagents and minimizing sample handling steps. Similarly, in plant studies, where metabolite diversity is vast, the simultaneous extraction methods must be optimized to account for the unique composition of plant tissues, which often include complex secondary metabolites and cell wall components. Looking forward, the development of more efficient and standardized simultaneous extraction methods will be crucial for advancing multi-omics research. There is a growing need for protocols that can be tailored to specific research needs, ensuring both reproducibility and flexibility in diverse applications. Additionally, combining these extraction methods with high-resolution analytical techniques such as mass spectrometry and next-generation sequencing will further enhance the potential of multi-omics studies to provide comprehensive insights into biological systems. As these technologies continue to evolve, their application in personalized medicine, environmental research, and agriculture holds great promise for addressing critical scientific challenges. In conclusion, while simultaneous extraction technologies have made significant strides, several challenges remain in optimizing extraction efficiency, ensuring reproducibility, and reducing costs. Future research should focus on refining extraction protocols, developing innovative extraction reagents, and expanding the scope of these methods to cater to a broader range of biological samples. Ultimately, the continued integration of these advanced techniques will revolutionize the way biological samples are prepared, analyzed, and understood in the context of multi-omics research.

Key words multi-omics research, metabolite extraction, nucleic acid extraction, dual extraction methods, TRIzol reagent method

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0465

CSTR: 32369.14.pibb.20250465