

Optimalizácia metódy pre izoláciu extracelulárnych vezikúl z plazmy

Miroslav Dolník¹, Eva Petrovčíková², Alexandra Kondelová², Ján Jurčík², Ivan Juráš²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; miroslavdolnik01@gmail.com

²Lambda Life a.s., Levočská 3617/3, 851 01 Bratislava, Slovenská republika

Úvod a formulácia cieľa

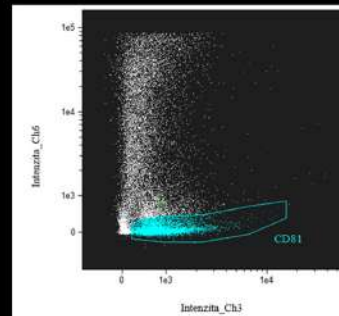
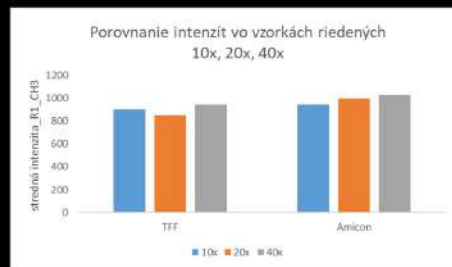
Extracelulárne vezikuly (EV) sú fosfolipidovou membránou ohraničené častice produkované všetkými bunkami v ľudskom tele a uvoľňované do extracelulárneho priestoru za fyziologických aj patologických podmienok. Zabezpečujú komunikáciu medzi bunkami, a to aj doručovaním svojho obsahu bioaktívnych molekúl (karga) do cieľovej bunky. EV sú zložené z proteínov, lipidov a nukleových kyselín. Unikátna skladba EV umožňuje, aby boli použité ako biomarkery pri rôznych chorobných stavoch vrátane onkologických chorôb, preto je kľúčové získať EV z patientskej plazmy s čo najmenšími stratami a v čo najvyššej čistote [1, 2, 3]. V našej práci sme sa rozhodli používať vylučovaciu chromatografiu podľa veľkosti (SEC) na izoláciu EV z plazmy za použitia maxiPURE-EV kolóny, ktorá produkuje nariadený izolát EV, ktorý je potrebné zakonzentrovávať pre analýzu pomocou zobrazovacej prietokovej cytometrie. Cieľom tejto práce bolo porovnanie dvoch ultrafiltračných metód koncentrácie EV, tangenciálnej prietokovej filtrácie (TFF) a koncentrátora Amicon. Konzentrovane vzorky EV sme analyzovali pomocou markera pre EV (CD81) za použitia zobrazovacej prietokovej cytometrie.

Metódy

Odobraná periférna krv zdravého dobrovoľníka v objeme 10 ml bola spracovaná diferenciálnou centrifugáciou pre prípravu plazmy (10 min / 300 x g → 20 min / 5 000 x g → 30 min / 16 000 x g) z ktorej boli izolované EV pomocou maxiPURE-EV kolóny (SEC). Vzorky boli následne zakonzentrovane pomocou TFF-Easy filtra a Amicon Ultra-15 10kDa. Výsledný zakonzentrovávaný objem EV bol 1 ml, z ktorého boli pripravené vzorky a potrebné kontroly. Vzorky EV (riedenia 10x, 20x, 40x) boli farbené markerom tetraspanín CD81-PE v tme 1 hodinu. Rovnakým postupom boli pripravené aj kontroly (EV+CD81-PE+Triton X-100; CD81-PE; PBS). Nakoniec boli vzorky a kontroly analyzované zobrazovacou prietokovou cytometriou (ImageStream Amnis MKII). Spracovanie dát prebiehalo pomocou softvéru IDEAS 6.3.

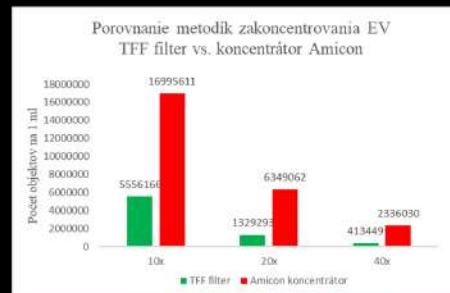
Výsledky

- Prítomnosť EV vo výslednej vzorke bola dokázaná pomocou EV markera tetraspanínu CD81-PE za použitia zobrazovacej prietokovej cytometrie.



- Stredná hodnota intenzity fluorescence v kanáli CD81 bola pre jednotlivé detegované objekty približne rovnaká.

- Vhodnejšou metodikou na zakonzentrovávanie EV po ich izolácii na kolóne maxiPURE je Amicon v porovnaní s TFF, pretože je účinnejší. V závislosti od riedenia bol počet objektov EV pre Amicon vyšší 3-6 x v porovnaní s TFF.



Záver

Z 10 ml krvi zdravého dobrovoľníka sme úspešne vyzolovali a analyzovali EV. Výsledky našej práce ukázali, že vhodnejšou metódou pre zakonzentrovávanie vzorky po SEC chromatografii je použitie ultrafiltrácie Amicon, ktorá umožňuje získať niekoľkonásobne väčšie počty EV, ako TFF. Získané poznatky sú základom pre ďalšiu optimalizáciu a zlepšenie prípravy vzoriek pre downstream analýzy EV.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Integrovaná stratégia v rozvoji personalizovanej medicíny vybraných zhubných nádorových ochorení a jej vplyv na kvalitu života (Kód projektu v ITMS 2014+: 313011V446), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

TFF

| Vzorka | Riedenia | | |
|-------------------------|-----------|-----------|---------|
| | 10x | 20x | 40x |
| EV+CD81-PE | 5 556 166 | 1 329 293 | 413 449 |
| EV+CD81-PE+Triton X-100 | 624 621 | 256 317 | 129 482 |
| CD81-PE | 102 162 | 28 374 | 8 867 |
| PBS | 0 | 0 | 0 |

Amicon

| Vzorka | Riedenia | | |
|-------------------------|------------|-----------|-----------|
| | 10x | 20x | 40x |
| EV+CD81-PE | 16 995 611 | 6 349 062 | 2 336 030 |
| EV+CD81-PE+Triton X-100 | 3 419 034 | 1 346 611 | 582 222 |
| CD81-PE | 228 437 | 69 004 | 25 989 |
| PBS | 0 | 0 | 0 |

• Vzorka

EV+CD81-PE: Koncentrácia EV vo vzorke klesala s každým riedením.

• Kontroly

EV+CD81-PE+Triton X-100: Vzorka inkubovaná s 0,1 % Triton X-100, ktorý rozrušil väčšinu EV. Kontrola obsahovala menej objektov ako vzorky obsahujúce len EV s protilátkou.

CD81-PE: Samotná protilátka v roztoku PBS, ktorej kryštály veľkosťou spadajú do kanálu CD81 rovnako ako EV. Namerané intenzity sú rádovo nižšie.

PBS: Intenzity pozadia samotného roztoku PBS boli nulové.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Doyle LM., Wang MZ. (2019) Cells. 8(7), p.727
- [2] Théry C., Witwer KW., Aikawa E., et al. (2018) J Extracell Vesicles. 7(1), p. 1535750
- [3] Welsh JA., Van Der Pol E., Arkesteijn GJA., et al. (2020) J Extracell Vesicli 9(1), :1713526