

Caracterización Mejorada de Vesículas Marcadas con Extracelulares Fluorescencia

AN242

Caracterización mejorada de vesículas extracelulares marcadas con fluorescencia utilizando ViewSizer 3000
por Sean Travers HORIBA Scientific, LSBD Equipo

Introduction

Los exosomas son pequeñas vesículas extracelulares, de 30 a 150 nm de diámetro, que se ha determinado que desempeñan un papel crucial en la señalización extracelular. Se han observado tanto en organismos procarióticos como eucariotas, lo que significa que están increíblemente encontrados en la naturaleza. Los exosomas brotan de sus células madre en un paquete sellado, llevándose consigo las propiedades de las paredes de sus células madre y envolviendo muchos componentes intracelulares. Se ha encontrado una amplia variedad de marcadores bioactivos encerrados en exosomas que incluyen, entre otros, proteínas, lípidos, ADN y ARN. Tras su formación, los exosomas se liberan en el espacio extracelular y se han encontrado en muchos fluidos corporales, incluidos: sangre, orina, saliva y leche materna.

La diversidad de esta carga ha llevado a que los exosomas tengan una letanía de funciones dentro del cuerpo que incluyen, entre otras: regulación inmune, regeneración de tejidos, progresión del cáncer y enfermedades neurodegenerativas. Pueden ser liberados por tejido sano o enfermo, y su composición se correlaciona con la salud de su célula madre, lo que les otorga un potencial significativo para diagnosticar enfermedades. Además, dado que los exosomas ya transportan carga de una célula a otra, se ha demostrado que reemplazar esa carga con terapias podría conducir a una administración de terapias dirigida de manera más confiable. Dado que adoptan las características de su célula madre, mantienen sus propiedades únicas; como cruzar barreras biológicas, incluida la barrera hematoencefálica, o exosomas derivados de células madre que muestran propiedades regenerativas o reparadoras.

Los exosomas son mediadores importantes en la comunicación entre células y son absorbidos por las células receptoras, liberando su carga en el proceso. La carga es increíblemente diversa e incluye desde factores de crecimiento, moléculas de señalización y enzimas, además de los mencionados anteriormente.



Caracterizar el Tamaño y la Concentración de Vesículas Extracelulares que Utilizan ViewSizer™ 3000

Diseño Experimental

Los exosomas se obtuvieron de Hansa BioMed y estos estudios se realizaron con material derivado de células HEK-293, que se almacenaron a -80°C . El etiquetado se realizó mediante un kit producido por SBI, catálogo EXONTA110A-1. Se siguieron las instrucciones según lo indicado. Las mediciones de NTA y fluorescencia se realizaron en el analizador de seguimiento de nanopartículas multiláser (NTA) simultáneo HORIBA ViewSizer 3000. Estos experimentos requirieron dos conjuntos diferentes de parámetros de grabación, uno para NTA. Ambos conjuntos de mediciones utilizan el movimiento browniano para determinar el tamaño de las partículas y contarlas mediante el seguimiento del movimiento de partículas polidispersas en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Para los datos de NTA de láser múltiple únicamente (todas las partículas), las mediciones se registraron con los siguientes parámetros: velocidad de fotogramas: 30 fotogramas/seg; exposición: 15 ms; ganancia: 30; potencia del láser azul: 210 mW; potencia del láser verde: 12 mW; y potencia del láser rojo: 8 mW; Control de temperatura: activo, 22°C . Se recopilieron 25 videos cortos con 3 segundos de agitación entre cada video y una espera de 5 segundos para garantizar conjuntos de partículas completamente independientes en cada video.

Para las mediciones fluorescentes, los parámetros fueron similares pero no idénticos y se colocó un filtro de paso

largo de 550 nm en la óptica para eliminar cualquier contribución de partículas no fluorescentes y el láser rojo (635 nm) se apagó para garantizar que no hubiera ninguna contribución de dispersión. Para los datos solo fluorescentes (solo partículas etiquetadas), las mediciones se registraron con los mismos parámetros con las siguientes excepciones: potencia del láser rojo: 0 mW. Se recopilaron 25 vídeos cortos con 2 segundos de agitación y una espera de 3 segundos.

Resultados

Cada medición se repitió seis veces en el modo NTA y en el modo Fluorescencia; los resultados se representaron para enfatizar NTA en la Figura 1 y Fluorescencia (FL) en la Figura 2.

Se puede ver el recuento total, el recuento etiquetado y el porcentaje. below with their standard deviation.

Los resultados muestran una reproducibilidad muy consistente en los recuentos tanto en el modo NTA como

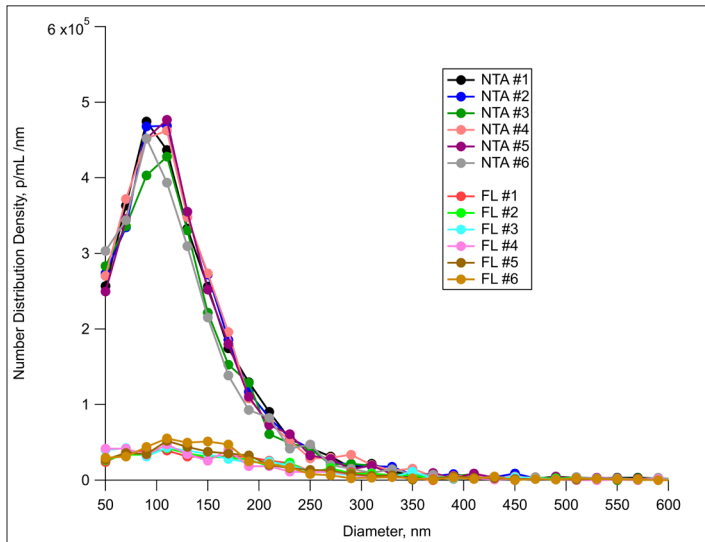


Figura 1: Poblaciones de Exosomas HEK-293 Marcadas y sin Etiquetar

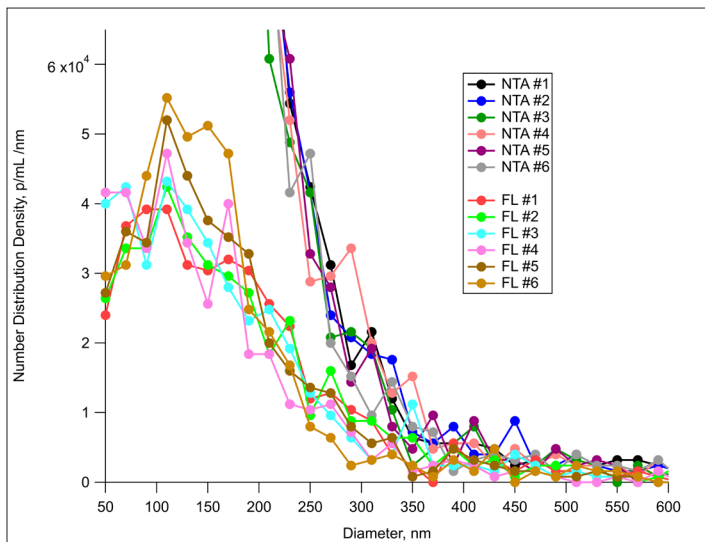


Figura 2: Población de Exosomas HEK-293 Marcada con Fluorescencia

Muestra	Recuento de Partículas	% Etiquetado
FL 1	7.380E+06	14.76
FL 2	7.300E+06	14.46
FL 3	7.140E+06	15.66
FL 4	6.690E+06	13.22
FL 5	7.700E+06	15.62
FL 6	7.870E+06	17.61
NTA 1	5.000E+07	
NTA 2	5.050E+07	
NTA 3	4.560E+07	
NTA 4	5.060E+07	
NTA 5	4.930E+07	
NTA 6	4.470E+07	
Promedio:		15.22
Desarrollo estándar:		1.47

Tabla 1: Recuentos de Partículas que Muestran FL. Exosomas HEK Etiquetados y no Etiquetados

en el FL. La concentración promedio de NTA fue $4.85e7 \pm 2.61e06$ (5.39%), mientras que para FL fue $7.35e6$

$\pm 4.19e5$ (5.70%) (Figura 1). El etiquetado fue bastante consistente con $15.22 \pm 1.47\%$ (Figura 2). El etiquetado es crucial para los estudios de exosomas, ya que están aislados de biofluidos complejos, lo que permite al investigador determinar cuántos exosomas están presentes y distinguirlos de partículas de tamaño similar.

Conclusión

Al utilizar ViewSizer tanto en modo NTA como de fluorescencia, pudimos detectar exosomas derivados de HEK-293 marcados y sin marcar con una gran reproducibilidad. La literatura actual sugiere que algunas etiquetas marcadas con fluorescencia tienen una eficiencia muy baja (~5%)¹. Aquí observamos ~15% de etiquetado con una desviación estándar adecuadamente pequeña. Estos resultados sugieren que ViewSizer es una herramienta excelente para caracterizar el tamaño y la concentración de vesículas extracelulares y que puede detectar poblaciones marcadas de exosomas etiquetados con fluorescencia con alta repetibilidad y precisión. El tamaño de la población marcada observada también sugiere que el kit de etiquetado utilizado por SBI es muy eficiente y una herramienta excelente para investigar poblaciones de exosomas cuando se combina con ViewSizer.

References

- Melling G, Conlon R, et al. *Nature Portfolio*, (2022) 12:262. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04225-4>