

非対称フローと遠心FFFによるエクソソーム内の癌バイオマーカーの分離測定

一般情報

ID0058

アプリケーション： エクソソーム、細胞外小胞、癌、バイオマーカー

テクノロジー： AF4-UV-MALS、CF3-UV、NTA、PCR

機器構成： AF2000、CF2000、PN3241 DAD UV-Vis、PN3621 MALS,
Malvern Nanosight NTA, PCR

キーワード： エクソソーム、癌、バイオマーカー、非対称フローFFF、
遠心FFF、PCR

はじめに

エクソソームは、癌診断[1,2]および治療用途に大きな可能性を秘めた核酸とタンパク質を含む小さな細胞外小胞です。エクソソームの特性評価は固有の異質性と複雑さのために困難です。

多角度的な測定結果を取得するには、様々な分離技術が必要になります。非対称フローFFF(AF4)と遠心FFF(CF3)は、高分子と生体ナノ粒子を流体力学的サイズ(AF4)および質量(CF3)に基づいて分離する高分解能分離技術です。本アプリケーションの目的は、AF4に接続した多角度光散乱(MALS)にてサイズ、および質量によって分離するCF3を使用して、MCF-7腫瘍エクソソームサンプルを評価することです。エクソソームの密度は、NTA(ナノ粒子トラッキング解析)とCF3によって測定した流体力学的直径と浮力質量により算出しました。フラクションはサイズと質量の両方の分布に沿って回収され、マイクロRNA21(miR21)癌バイオマーカーを増幅するためにPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)によって分析されました。

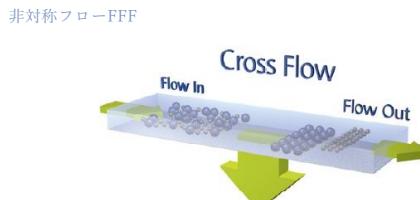
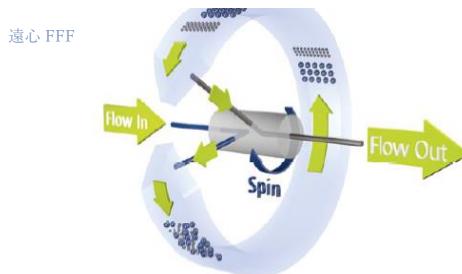


図1：CF3とAF4の分離メカニズム。CF3チャネルは回転軸の周りを円形に取り囲み、チャネルフローに垂直な遠心力場を回転することで生成します。質量の小さい粒子は、遠心力場に向かって拡散してより速いチャネルフロープロファイルにより、重い粒子よりも早く溶出します。AF4では、分離フィールドはチャネルフローに垂直なクロスフローによって生成されます。 小さいサイズの粒子は、クロスフローフィールドに向かって拡散してより速いチャネルフロープロファイルにより、大きい粒子よりも早く溶出されます。

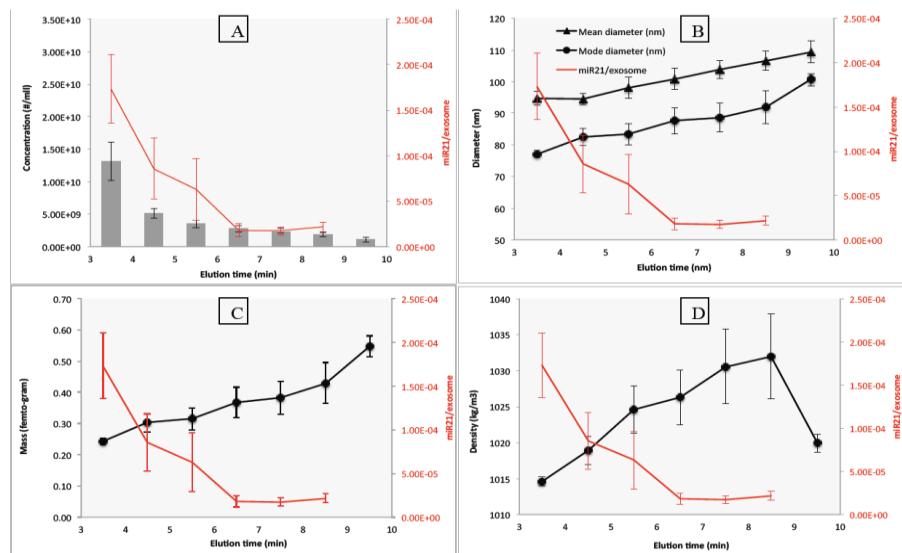


図2：FFF溶出時間（x軸）対 miR21 増幅/エクソソーム（右のy軸）のプロット

左のy軸はプロットによって異なり、エクソソーム濃度（A）、直径（B）、質量（C）、および密度（D）

測定詳細と結果

AF4とCF3で測定された物理化学的パラメーターに対するmiR21増幅の関係を図2に示します。図2(B)によると、サイズ(左のy軸)が増加すると増幅(右のy軸)は減少するので、miR21で増幅されたエクソソームはAF4-MALSとNTAで測定した増幅前のエクソソームよりもサイズが小さくなる傾向があります。図2(C)はCF3分離で測定されたエクソソームの質量の増加に伴うmiR21増幅の低下を示しています。CF3による質量分離とNTAを組み合わせると、エクソソーム密度が得られます。これは、図2(D)でmiR21増幅に対してプロットされています。癌バイオマーカーの増幅は密度の増加とともに減少します。

まとめ

MCF-7腫瘍エクソソームサンプルは、RMS半径(MALSデータ非表示)で30~100 nm、流体力学的直径で50~200 nmの広いサイズ分布を示しました。これらのサンプルは固有の異質性のためバッチ式動的光散乱またはNTA測定でエラーを起こしやすく、これらの複雑な生体サンプルの分離および特性評価におけるFFFの有用性が証明されました。このアプリケーションは、miR21癌バイオマーカーの増幅が、最小サイズ、最小質量、および最小密度の腫瘍エクソソームで最も高いことを示しました。

参考文献

- [1] Peng et al. Oncotarget. 2017 Jul 4; 8(27): 44893-44909.
- [2] Wei et al. Chin J Cancer. 2011 Jun; 30(6): 407-414.