

OptiPrep® Centrifuge CP100NX を用いた 密度勾配遠心法によるエクソソームの精製

Pascal Rowart^{1*}, Vincent Dufey¹, Jan Knop², Françoise De Longueville¹

¹ Eppendorf Application Technologies S.A., Namur, Belgium

² Eppendorf SE, Hamburg, Germany

* rowart.p@eppendorf-eat.be

要旨

このショートプロトコルでは、Centrifuge CP100NX と Rotor P32ST を用いて、40PET チューブ内に作製した密度勾配液によりエクソソームを精製する方法を説明します。

はじめに

エクソソームは、直径約 30 ~ 150 nm の脂質二重膜からなるナノスケールの顆粒状小胞です。血液、唾液、尿、羊水などの体液や細胞培養液中に存在します^{1,2}。細胞内膜と細胞膜が融合した後、細胞外マトリックスに放出されます³。

近年、エクソソームが様々なタンパク質や RNA (mRNA、miRNA) を含んでいることが報告されており、細胞間の情報伝達の役割を担っていると考えられています⁴。この性質を利用して、バイオマーカーや標的治療薬用ツールとしての開発が盛んに行われています。高純度、高品質のエクソソームの分離には密度勾配超遠心分離が有効です⁵。

アプリケーションノート 476⁶では、超遠心分離と組み合わせ

たスクロースクッション法を用いて、シングルユースのバイオリアクターで培養された幹細胞から、純度の高い単一なエクソソームの分離に成功しました。分離したエクソソームは、さらに時間をかけて密度勾配遠心を行うことにより、下流アプリケーション用に精製することもできます。このショートプロトコルはそのために作成されました。

このショートプロトコルでは、Centrifuge CP100NX と Rotor P32ST を用いた OptiPrep® 密度勾配遠心法による高純度エクソソームの精製方法を説明しています。超遠心機、スイングローターを用いて、40PET チューブ内に作成した密度勾配液により、高純度のエクソソームを大量に精製することができます。

材料と方法

このショートプロトコルで使用する PBS に懸濁した粗エクソソームは、アプリケーションノート 476⁶に記載されているスクロースクッション法 (図 1- (B)) を用いて分離しました (図 1- (A))。

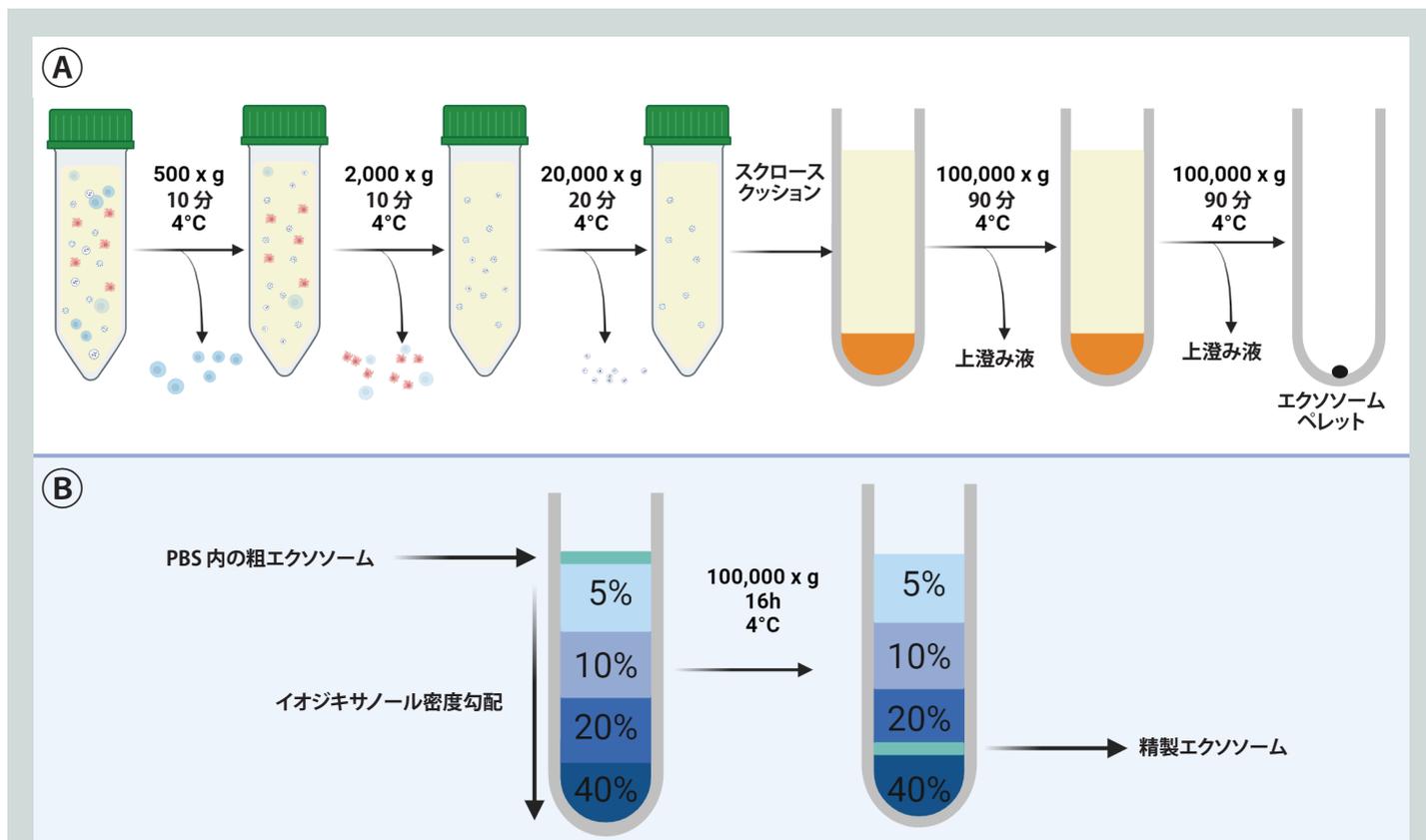


図 1 - ワークフロー概略図

(A) : スクロースクッション法によるエクソソームの分離

(B) : 超遠心機による OptiPrep[®] (イオジキサノール) 密度勾配遠心法を用いたエクソソーム精製

画像は Biorender.com を利用して作成

機器と試薬

- > Centrifuge CP100NX
- > Rotor P32ST
- > 40PET チューブ
- > OptiPrep[®] (イオジキサノール、AXS-1114542)
- > スクロース (ショ糖)

密度勾配媒体

OptiPrep[®] 60 % イオジキサノール溶液を原液として使用し、等浸透圧のスクロース溶液で希釈することで、さまざまな濃度のイオジキサノール溶液を調製します。OptiPrep[®] の原液の密度は 1.32 g/cm³ です。スクロースは、30 mM Tris-HCl 溶液に 0.25 M の濃度で調整します。

60 % イオジキサノールと 0.25 M スクロース溶液を混合することにより、4 段階の濃度の溶液 (5%、10%、20%、40%) を調製します。図 2- (A) に示すように、40PET チューブに溶液を重層します。

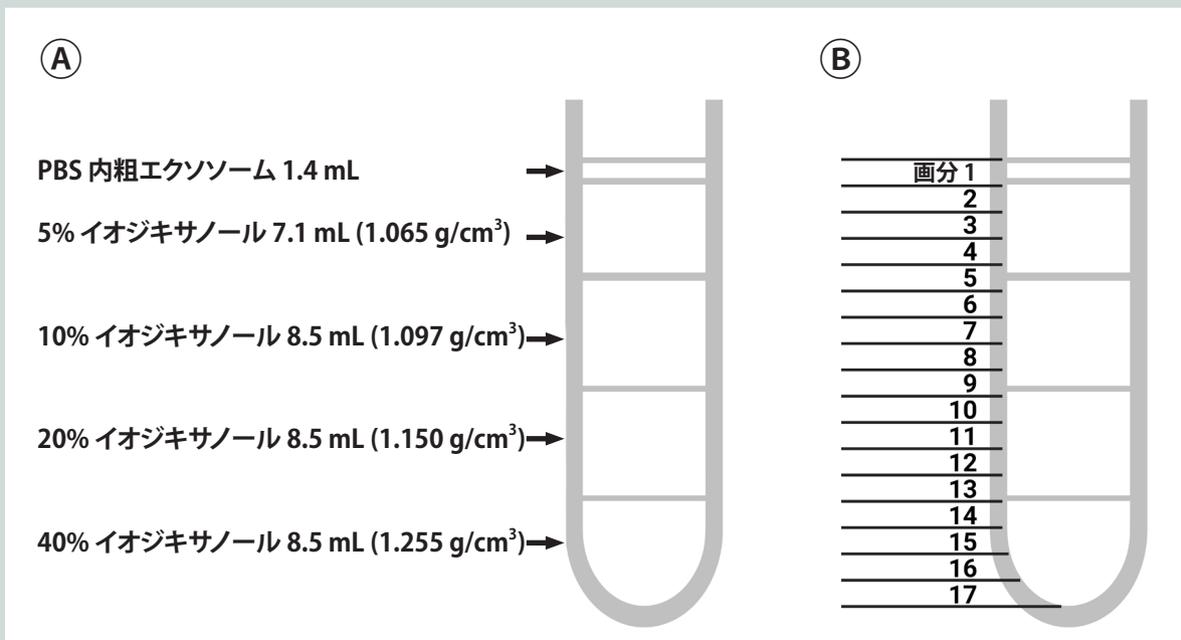


図 2 – 遠心分離前の密度勾配の層と組成の概略図 (A)。遠心分離後、上から下に 2 mL ずつ画分し溶液を回収します (B)。

画像は Biorender.com を利用して作成

エクソソームの分離

超遠心機を用いたスクロースクッション法⁶で粗精製したエクソソームを、40PET チューブ内の密度勾配溶液の上に慎重に重層します (図 2- (A))。チューブを Rotor P32ST のバケットにセットし、100,000 x g、4°C で、Centrifuge CP100NX で 16 時間遠心分離します (図 3)。加速レートは 7、減速レートは 0 に設定します。

エクソソームの回収

遠心分離後、エクソソームは 1.15 ~ 1.19 g/cm³ の密度範囲に濃縮されますので、上から 2 mL ずつ、17 の画分に回収します。(図 2- (B))。Concentrator plus (遠心濃縮機) で 135 分間濃縮し、各画分の容量を 300 μL まで減らします。画分は動的光散乱を使用して分析します。



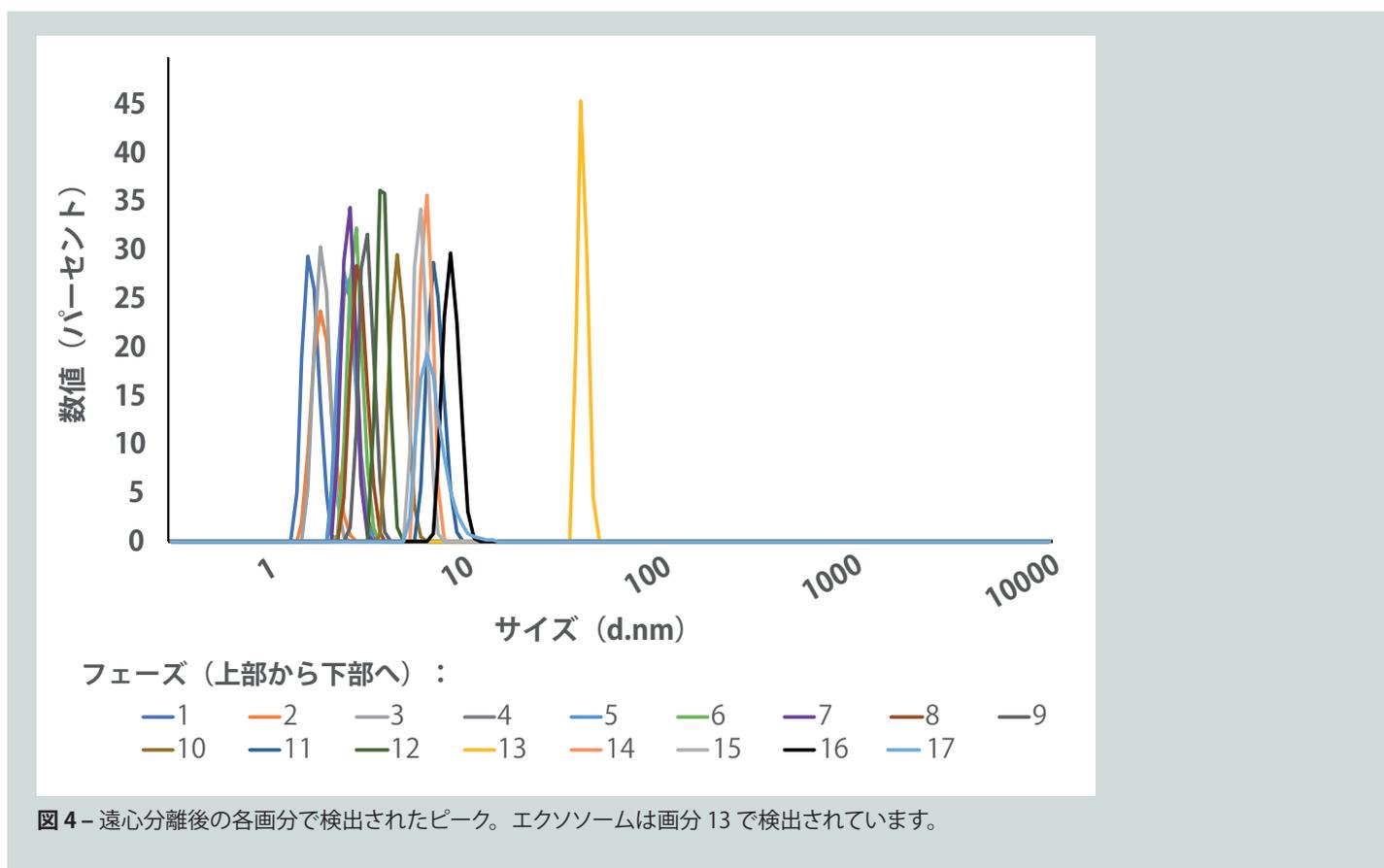
図 3 – Centrifuge CP100NX と Rotor P32ST

結果と考察

遠心分離後、エクソソームは 20% と 40% との境界に相当する画分 13 でのみ検出されました。動的光散乱を使用して、純粋で単一の約 60 nm のエクソソームのピークが検出されました。バックグラウンドノイズを表すピークが他のすべての画分で検出されています (10 nm 未満 - 図 4)。

密度勾配遠心法は、スクロースクッション法⁶やそのほかの超遠心機を用いた分離法と比較して、高純度のエクソソームを分離

することができます。スクロースクッション法は、研究の目的に応じた、高純度で単一のエクソソームを分離することができます。また臨床研究や治療には、さらに純度の高いエクソソームが求められる場合があります。ここでは、スクロースクッション法で分離された高純度で単一のエクソソームを OptiPrep[®] 密度勾配法で濃縮・精製しており、約 60 nm の単一の狭いピークが表すとおり、エクソソームの歪みや不均一性が無いことを示しました。



培地の初期量またはプロジェクトの規模に応じて、エクソソームの分離にはいくつかのローターソリューションを用意しています。

ローター	容量	最大遠心加速度 (x g)
P32ST	6 x 40 mL (PET チューブ)	180,000
P40ST	6 x 13 mL (PET チューブ)	284,000
P56ST	6 x 4 mL (PET チューブ)	409,000

参考文献

- [1] Iraci N, Leonardi T, Gessler F, Vega B, Pluchino S. Focus on extracellular vesicles: Physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles. *Int J Mol Sci.* 2016;17(2). doi:10.3390/ijms17020171
- [2] Tamkovich SN, Tutanov OS, Laktionov PP. Exosomes: Generation, structure, transport, biological activity, and diagnostic application. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* 2016 10:3. 2016;10(3):163-173. doi:10.1134/S1990747816020112
- [3] Liebner S, Cavallaro U, Dejana E. The multiple languages of endothelial cell-to-cell communication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(7):1431-1438. doi:10.1161/01.ATV.0000218510.04541.5E
- [4] Yoon YJ, Kim OY, Gho YS. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. *BMB Rep.* 2014; 47(10):531-539. doi:10.5483/BMBRep.2014.47.10.164
- [5] Coughlan C, Bruce KD, Burgy O, et al. Exosome Isolation by Ultracentrifugation and Precipitation: A Comparison of Techniques for Downstream Analyses. *Curr Protoc Cell Biol.* 2020;88(1):e110. doi:10.1002/CPCB.110
- [6] Rowart P, Dufey V, Knop J, De Longueville F. Fast and Efficient Isolation of Exosomes from Stem Cells Using a Combination of Single-Use Bioreactors, High-Speed- and Ultracentrifugation.; 2023. <https://www.eppendorf.com/exosomes/>

注文情報

製品	メーカー	注文番号
Centrifuge CP100NX	Eppendorf	5720110010
Rotor P32ST	Eppendorf	5720214003
40PET チューブ	Eppendorf	5720411148
Rotor P40ST	Eppendorf	5720214009
Rotor P56ST	Eppendorf	5720214104

Your local distributor: www.eppendorf.com/contact
 Eppendorf SE · Barkhausenweg 1 · 22339 Hamburg · Germany
eppendorf@eppendorf.com · www.eppendorf.com

www.eppendorf.com

Methods are intended for molecular research applications. They are not intended, verified or validated, for use in the diagnosis of disease or other human health conditions. KAPA products are for research use only, not for use in diagnostic procedures. Eppendorf SE reserves the right to modify its products and services at any time. This Short Protocol is subject to change without notice. Although prepared to ensure accuracy, Eppendorf SE assumes no liability for errors, or for any damages resulting from the application or use of this information. Viewing this Short Protocol alone cannot as such provide for or replace reading and respecting the current version of the operating manual.

OptiPrep® is a registered trademark of Serumwerk Bernburg AG, Germany.
 Eppendorf® and the Eppendorf Brand are registered trademarks of Eppendorf SE, Germany. Himac® is a registered trademark of Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd., Japan.
 All rights reserved, including graphics and images. Copyright © 2024 by Eppendorf SE.