

Оптимизация подхода выделения экзосом из культуральной среды и метода аффинного разделения вирионов ВГА и экзосом.

Научный руководитель – Васин Андрей Владимирович

Пурвиньш Лада Вольдемаровна

Выпускник (магистр)

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург,
Россия

E-mail: ladushka1395@mail.ru

Экзосомы - внеклеточные мембранные везикулы диаметром 40-100 нм. Они входят в состав клеточного секрета наряду с микровезикулами и апоптотическими тельцами и являются ключевым средством межклеточной коммуникации. С их помощью происходит перенос широкого спектра биологически активных молекул, включая липиды, белки, мРНК и микроРНК. Передача этих молекул клеткам-реципиентам регулирует их функции в норме и вносит вклад в патогенез множества заболеваний.

Для анализа строения и биохимического состава экзосом, а также их роли в развитии различных заболеваний необходимы полностью воспроизводимые, стандартизованные протоколы получения высокоочищенных препаратов экзосом из различных биологических жидкостей и культуральной среды. Существующие методики для выделения экзосом не являются универсальными для всех биологических жидкостей и требуют оптимизации для каждого из исследуемых образцов.

В настоящей работе мы провели сравнение эффективности выделения экзосом из культуральной среды тремя разными методами: 1) ультрацентрифугированием, 2) концентрированием тангенциальной потоковой фильтрацией с последующей гель-фильтрацией, 3) осаждением экзосом с помощью коммерческого реагента. С помощью просвечивающей электронной микроскопии, Вестерн-блоттинга и динамического светорассеяния было показано, что оптимальным методом для выделения экзосом из культуральной среды является гель-фильтрация предварительно сконцентрированного образца. Данный подход обеспечивает несоизмеримо более высокую чистоту препаратов экзосом по сравнению с остальными.

Для исследования экзосом из клеток, инфицированных вирусом гриппа А, требуется дополнительное разделение самих экзосом и совыделяющихся с ними вирусных частиц. Для выполнения данной задачи была применена аффинная хроматография с использованием моноклональных антител к гемагглютинину вируса гриппа А. В процессе разделения вирусные частицы остаются связанными с антителами, а клеточные экзосомы, не имеющие на поверхности гемагглютинина, элюируются с колонки. Эффективность данного метода была оценена с помощью электронно-микроскопического и электрофоретического анализа получаемых хроматографических фракций.

Таким образом нами были отработаны и оптимизированы подходы для выделения экзосом из культуральной среды и разделения экзосом и вирионов после инфицирования клеток ВГА. Полученные высокоочищенные препараты клеточных экзосом пригодны для дальнейшего исследования их протеома и транскриптома, а также возможного участия экзосом из инфицированных клеток в патогенезе заболевания.

Исследование поддержано Российским Научным Фондом, грант 20-15-00228.