

総タンパク質量は、Extracellular vesiclesの量を反映しない

ー テトラスパニンELISAによるEV収量の比較 ー

はじめに

Extracellular vesicles (EV) の精製法には、超遠心分離法、密度勾配超遠心分離法といった旧来の方法から、各社が販売するそれぞれ原理の異なるキットまで、多数の方法が存在するが、精製法によって必要とされるサンプル量や、得られるEVの純度が異なることが知られている¹⁾。そのため、研究の目的に合わせて適切な精製法を選ぶことが重要である。各精製法を比較した報告が複数発表されており、それらは適切な精製法を選択する際の参考になるであろう。

しかしながら注意が必要なのは、精製法の違いによって回収されるEVも夾雑物の種類も異なるという状況では、各手法の比較を正確に行うことは困難であるという点である。そのためMISEV2018²⁾では、精製方法そのものや、それにより得られるEVの評価は、互いに相補的な複数の手法で評価することが重要とされている。

EVの収量を比較する際、粒子数、総タンパク質量、総脂質量などが一般的に計測される。粒子数を評価する方法としては、Nano Tracking Analysis (NTA) のような光散乱を利用した方法や、Flow cytometryを利用した方法が知られている。また、タンパク質量の評価方法としてはBCA (bicinchoninic acid) 法のような比色法や、蛍光検出法などが用いられる。しかし、いずれの方法も元サンプルに由来するEV以外の夾雑物質の影響を受け、EV量を過剰に評価してしまう場合があるという点に留意しておく必要がある²⁾。EVマーカーであるテトラスパニンをターゲットにしたELISA法も、EVを定量する方法として提案されている。EV表面のテトラスパニンマーカーの発現量は、EV産生に用いる細胞の培養条件によっても変動することが知られているため³⁾、異なるサンプルから調製したEV量を比較するには注意が必要である。しかし同じソースからEVを精製し、精製効率を比較する方法としては有用である。

ここでは、超遠心分離法で精製したEVと、当社のEV精製キットであるMagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2によって精製したEVの収量を、CD9、CD63、CD81の3種のEVマーカーを標的としたサンドイッチELISAで比較した結果を紹介する。また同じ検体の粒子数と総タンパク質量も測定し、それらの結果が一致するかを検証した。

方法

EVの精製

10% EV depleted FBSを含むDMEMで培養した骨髄由来MSCの培養上清 1mLから、超遠心分離法 (UC法)、およびMagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (富士フイルム和光純薬, 290-84103) を用いてEVを精製した (PS法)。精製前後、および遠心上清、ピーズ素通り画分の溶液を検体としてEV収量を比較した。

UC法

- 110,000×g 70min 遠心
- PBS Wash × 1
- 110,000×g 70min 遠心
- EV-Save™ 細胞外小胞ブロッキング試薬 (富士フイルム和光純薬, 058-09261) 含有PBS 100 μLで懸濁

PS法

- キット添付文書に則り精製した
- EV-Save™含有PBS 50 μLで2回抽出し、100 μLの精製産物を得た

テトラスパニンELISA

EVマーカーを標的とする3種のELISAキットを用いて、EVマーカーシグナル量を測定した。測定はキット添付のプロトコルに則って行った。

標準物質として、予めNTAで粒子数を測定した骨髄MSC由来EVを同時に測定し、得られた標準曲線から各検体のEV濃度 (AU/mL) (Arbitrary Unit) を算出した。

使用したELISAキット

- ① 捕捉抗体: CD9、検出抗体: CD9
CD9-Capture Human Exosome ELISA Kit (富士フイルム和光純薬, 296-83701)
- ② 捕捉抗体: CD63、検出抗体: CD63
CD63-Capture Human Exosome ELISA Kit (富士フイルム和光純薬, 290-83601)
- ③ 捕捉抗体: CD81、検出抗体: CD81
CD81-Capture Human Exosome ELISA Kit (富士フイルム和光純薬, 292-83801)

NTA

NTAはナノサイトNS300 (Malvern Panalytical) を用いて実施した。

総タンパク質量測定

総タンパク質量はBCA法により測定した。測定方法はプロテインアッセイBCA試薬 (富士フイルム和光純薬, 297-73101) の高感度法に従った。

結果

CD9、CD63、CD81いずれのEVマーカーを標的とするサンドイッチELISAにおいても、PS法で回収したEV溶液からは超遠心分離法より多くのEVマーカーシグナルが検出された。超遠心分離法では遠心上清に多くのEVマーカーシグナルが検出され、PS法ほど効率よくEVを回収できていないことが示された (図1)。

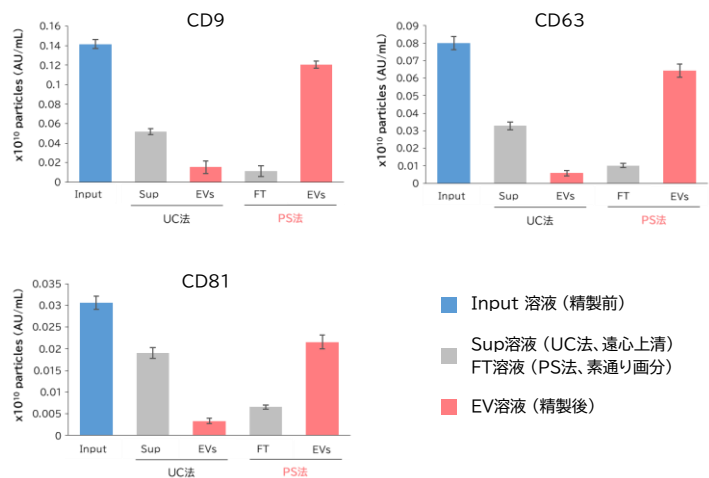


図1. テトラスパニンELISAによるEV収量の比較

次に、それぞれの精製法で精製したEV溶液の粒子数をNTAで測定したところ、ELISAの結果と同様、PS法で精製した方が多くの粒子を含んでいた (表1)。ところが、総タンパク質量を測定すると、UC法で精製した検体の方が高い値を示した (表2)。先述の2つの結果とは相反することから、タンパク質量比較では非EV由来の夾雑タンパク質を含めて測定してしまうことにより、UC法検体の方が高値となっている可能性が示唆される。

表1 NTAによる粒子数の比較

	粒子数
UC法	0.09 × 10 ¹⁰ particles/mL
PS法	0.21 × 10 ¹⁰ particles/mL

表2 BCAによる総タンパク質量の比較

	タンパク質濃度
UC法	30.45 μg/mL
PS法	11.84 μg/mL

結論

- 超遠心分離法、PS法により精製したEVの収量を、ELISAによるEVマーカーシグナル量および、NTAによる粒子数で比較すると、PS法で精製した検体の方が多くのEVを回収できていた。
- 総タンパク質量の比較では、夾雑タンパク質を測りこんでしまうため、EV量を正しく比較できない可能性がある。

参考文献

- 1) Doyle, L. *et al.*: *Cells*, **8**, 727 (2019).
- 2) Théry, C. *et al.*: *J. EXTRACELL. VESICLES*, **7**, 1535750 (2018).
- 3) Ma, Y. *et al.*: *Sci. Reports*, **11**, 13471 (2021).

Technical Report

Total protein amount does not reflect extracellular vesicle amount

- Comparison of EV yields evaluated by tetraspanin ELISA -

Introduction

There are many extracellular vesicle (EV) purification methods, ranging from conventional methods such as standard ultracentrifugation and density-gradient ultracentrifugation to use of kits based on various principles sold by many companies. It is known that the sample amount needed and the purity of EVs obtained differ depending on the purification method¹⁾. It is therefore important to choose an appropriate purification method according to the purpose of the research. Several reports comparing purification methods have been published and can guide the choice of appropriate method.

A point to be noted, however, is that it is difficult to accurately compare methods under the circumstances that EVs recovered and impurity types vary with the purification method. For this reason, according to MISEV2018²⁾, it is important to use multiple, complementary methods for evaluation of the purification method itself and of the EVs obtained.

To compare EV yields, parameters including particle number, total protein amount, and total lipid amount are generally measured. For evaluating the particle number, methods using light scattering, such as Nano Tracking Analysis (NTA), and flow cytometry are known. For evaluating the protein amount, colorimetric methods such as BCA (bicinchoninic acid) assay and fluorescent detection are used. It should be noted that every method may be affected by contaminants in the original sample, resulting in overestimation of the EV amount²⁾.

ELISA targeting tetraspanin EV markers has also been proposed as a method for EV quantification. As it is known that the expression level of tetraspanin markers on the surface of EVs varies depending on the culture conditions of the cells used for EV production,³⁾ caution should be exercised when comparing EV amounts prepared from different samples. However, the ELISA is useful as a method for comparing the purification efficiency of EVs purified by different methods from the same source.

This article describes the result of comparing the yield of EVs purified by ultracentrifugation with that of EVs purified using our EV purification kit, MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 with sandwich ELISA kits targeting each of three EV markers, CD9, CD63, and CD81. In addition, particle number and total protein amount of the same sample were also measured, and the consistency of the results was verified.

Methods

Purification of EVs

EVs were purified from 1 mL of culture supernatant of bone marrow-derived MSC cultured in DMEM containing 10% EV depleted FBS by ultracentrifugation (UC method) or using MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver. 2 (Fujifilm Wako, 290-84103) (PS method). Solutions before and after purification, centrifuge supernatant, and bead flow through fraction were used as samples and their EV yields were compared.

UC method

1. Centrifuged at 110,000×g for 70 min.
2. PBS Wash × 1
3. Centrifuged at 110,000×g for 70 min.
4. Suspended in 100 μL of PBS containing EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent (Fujifilm Wako, 058-09261).

PS method

1. Purified in accordance with the package insert of the kit.
2. Extracted twice with 50 μL of PBS/EDTA containing EV-Save™ to obtain 100 μL of purified product.

Tetraspanin ELISA

Three ELISA kits targeting EV markers were used to measure EV marker signal levels. Measurements were performed in accordance with the protocol attached to the kit. As a reference material, bone marrow MSC-derived EVs for which the number of particles was previously measured by NTA was simultaneously measured, and the EV concentration of each sample was calculated in arbitrary units (AU/mL) based on the standard curve obtained.

ELISA kits

- ① Capture antibody, anti-CD9 Ab; Detection antibody, anti-CD9 Ab
CD9-Capture Human Exosome ELISA Kit (Fujifilm Wako, 296-83701)
- ② Capture antibody, anti-CD63 Ab; Detection antibody, anti-CD63 Ab
CD63-Capture Human Exosome ELISA Kit (Fujifilm Wako, 290-83601)
- ③ Capture antibody, anti-CD81 Ab; Detection antibody, anti-CD81 Ab
CD81-Capture Human Exosome ELISA Kit (Fujifilm Wako, 292-83801)

NTA

NTA was performed using NanoSight NS300 (Malvern Panalytical).

Measurement of total protein amount

The total protein amount was measured using BCA assay, the highly sensitive method of Protein Assay BCA Reagent Kit (Fujifilm Wako, 297-73101).

Results

The sandwich ELISA targeting each of the EV markers, CD9, CD63, and CD81, detected stronger EV marker signal in the EV solution recovered by the PS method than that recovered by the UC method. Strong EV marker signal was detected in the supernatant obtained by ultracentrifugation, showing that recovery of EVs by the UC method was not as efficient as by the PS method (Figure 1).

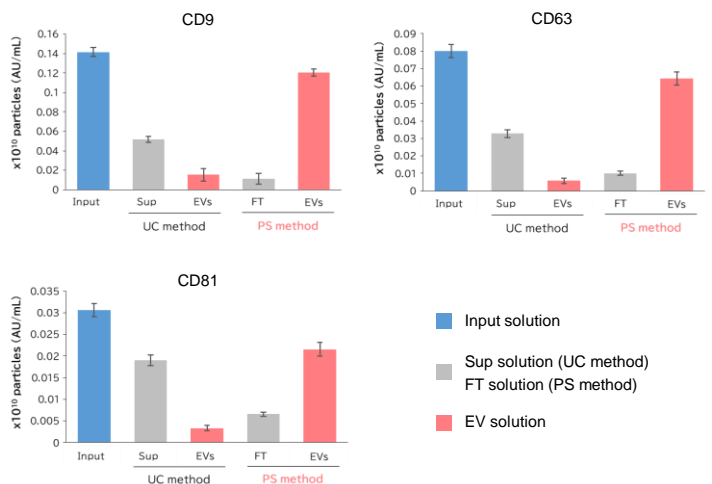


Figure 1. Comparison of EV yields evaluated using tetraspanin ELISA

Next, the particle number in EV solution purified by each purification method was measured by NTA. Consistent with the result of ELISA, more particles were found in EV solution purified by the PS method (Table 1). However, the total protein amount measured was higher in the sample purified using the UC method (Table 2). As this result is contradictory to the above results, it is suggested that the protein amount in the sample purified by the UC method may have been higher because contaminant proteins derived from substances other than EVs were included in the total protein measurement.

Table 1. Comparison of particle numbers counted using NTA

	Number of particles
UC method	0.09 × 10 ¹⁰ particles/mL
PS method	0.21 × 10 ¹⁰ particles/mL

Table 2. Comparison of total protein amounts measured using BCA

	Protein amount
UC method	30.45 μg/mL
PS method	11.84 μg/mL

Conclusion

- EV yields were compared after purification using UC and PS, based on EV marker signal level evaluated by ELISA and particle number counted by NTA. The results showed that more EVs were recovered in the sample purified using the PS method.
- As the total protein amount may include contaminant proteins, comparison of the EV amount based on total protein amount may yield incorrect results.

References

- 1) Doyle, L. et al.: *Cells*, **8**, 727 (2019).
- 2) Théry, C. et al.: *J. EXTRACELL. VESICLES*, **7**, 1535750 (2018).
- 3) Ma, Y. et al.: *Sci. Reports*, **11**, 13471 (2021).