

Extracelluláris vezikulák infravörös spektroszkópai jellemzése: fehérje és lipid mennyiségének jelölésmentes meghatározása

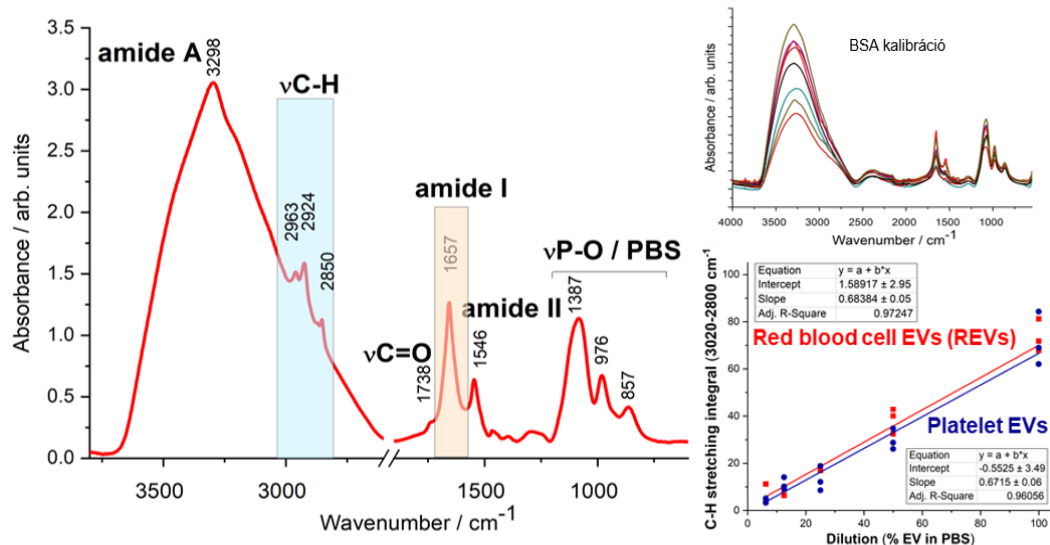
Infrared spectroscopic characterization of extracellular vesicles: label free determination of protein and lipid content

BEBESI T., SZENTIRMAI V., KITKA D., SZIKSZAI B., RÁCZ A., BÓTA A., WACHA A., VARGA Z., MIHÁLY J.

Biológiai Nanokémiai Kutatócsoport, Anyag- és Környezetkémiai Intézet,
Természettudományi Kutatóközpont,
1117 Budapest, Magyar tudósok körútja 2.

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) spontaneously released by cells play an important role in intercellular communication. Due to their special composition and size (nanosystems bounded by a lipid bilayer, usually below 200 nm, which also contain proteins and RNA), methods for their characterization are still under development. Infrared (IR) spectroscopic methods have been used in the last few years to characterize EVs, but the possibilities offered by the method have not yet been fully explored. Because IR spectroscopy simultaneously provides information about proteins, lipids, and / or other EV components, a single quantification protocol could be sufficient for both proteins and lipids (phospholipids).



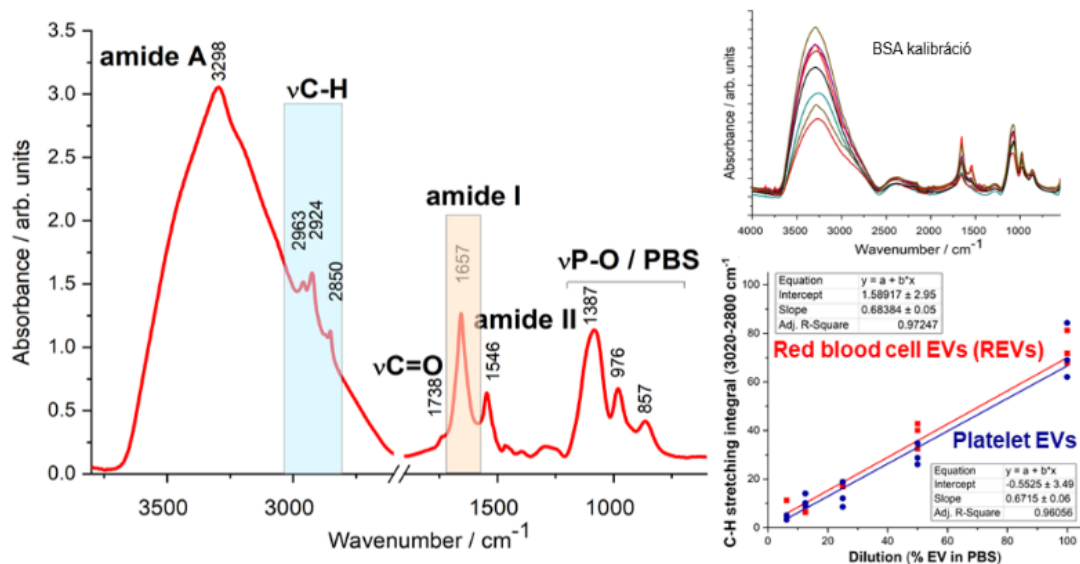
Large EVs (microvesicles) formed *ex vivo* in erythrocyte concentrates were examined by IR spectroscopy. The integrated area of the amide band I was shown to be proportional to the amount of protein in the EV samples (up to 1 mg / ml), regardless of its secondary structure. Results based on bovine serum albumin (BSA) calibration were also supported by multivariate data analysis of the raw spectra (least squares regression).

Lipids are essential molecular components of EVs, but there is currently limited knowledge about their quantification. We aim to develop an appropriate lipid calibration with reference vesicles prepared from bovine serum albumin and synthetic lipids, thereby extending the possibilities of IR spectroscopy.

Keywords: Extracellular vesicles, infrared spectroscopy, protein quantification, lipid quantification

ÖSSZEFOGLALÓ

A sejtek által spontán kibocsátott extracelluláris vezikulák (EV-k) fontos szerepet töltenek be a sejtek közti kommunikációban. Speciális összetételüknek és méretüknek (lipid kettősréteggel határolt, általában 200 nm alatti nanorendszerek, amelyek fehérjéket és RNS-t is tartalmaznak) köszönhetően a jellemzésükre alkalmazható módszerek még fejlesztés alatt állnak. Infravörös (IR) spektroszkópiai módszert az utóbbi pár évben alkalmazzák EV-k jellemzésére, de a módszer által nyújtott lehetőségek még nincsenek teljes mértékben kiaknázva. Mivel az IR spektroszkópia egyidejűleg információt nyújt a fehérjékről, lipidekről és / vagy más EV komponensekről, egyetlen kvantifikációs protokoll mind a fehérjékhez, mind a lipidekhez (foszfolipid) elegendő lehetne.



Az eritrocita koncentrátumokban ex vivo képződött nagy méretű EV-eket (mikrovezikulák) IR spektroszkópiával vizsgáltuk. Az amid I sáv integrált területe bebizonyosodott, hogy arányos az EV-minták fehérjemennyiségével (legfeljebb 1 mg / ml), függetlenül annak másodlagos szerkezetétől. Marha-szérum albumin (BSA) kalibráción alapuló eredményeket a nyers spektrumok többváltozós adatelemzése (legkisebb négyzetek regressziója) is alátámasztotta.

Az EV-k elengedhetetlen molekuláris komponensei a lipidek, de pillanatnyilag számszerűsítésükről csak korlátozott ismeretek állnak rendelkezésre. Arra törekszünk, hogy kidolgozzunk egy megfelelő lipid kalibrációt marha-szérum albumin és szintetikus lipidekből készített referencia vezikulákkal, és ezáltal az IR spektroszkópia lehetőségeit kibővítsük.

A kutatás az NKFIH K 131594 és K 131657 OTKA pályázatok támogatásával készült.

Kulcsszavak: Extracelluláris vezikula, infravörös spektroszkópia, fehérje mennyiségi meghatározás, lipid mennyiségi meghatározás