

## 运用Leprechaun提升细胞外囊泡表征能力

### 简介

分析样品中的所有细胞外囊泡 (EVs) 而不遗漏关键的颗粒, 是一个具有挑战性的任务。原因是细胞外囊泡体积很小, 并且复杂样品中存在大量粒径相似的非 EVs 颗粒。由于 Evs 共纯化残留的污染物包括脂蛋白、蛋白聚集体和牛来源的 EVs<sup>①</sup>, 这个问题变得更加棘手。大多数常见的颗粒表征工具, 如纳米粒跟踪分析 (NTA) 和可调电阻式脉冲传感器 (TRPS), 无法区分细胞外囊泡和其他颗粒, 这意味着它们会把垃圾和真金混为一谈。

Leprechaun 利用免疫捕获将 EVs 与其他颗粒分离, 确保只计数所关心的囊泡。它是一款能够在单囊泡基础上提供囊泡浓度、大小和表型分析 (包括载荷) 的平台, 且无需进行样品纯化 (图 1)。Leprechaun 在其前身 ExoView R200 的技术基础上进行改进, 具有更低的粒径检测下限 (35 nm), 为包含外泌体到外泌微粒在内、全面的、无需纯化的 EVs 分析打开了大门。



图1: Leprechaun——EV分析的新时代

该应用描述了 Leprechaun 如何对更小的 EVs 进行粒径测定, 以揭示先前未被检测到的颗粒, 并比较了 Leprechaun 相对于 ExoView R200 的性能优化。

## 在Leprechaun上进行囊泡分析

Leprechaun 的人源 Tetraspanin Luni 芯片可以在 anti-CD81、anti-CD9 和 anti-CD63 抗体位点上捕获 EVs。Luni 表面的免疫捕获意味着在分析之前无需纯化样本，使 Leprechaun 能够表征来自粗制或纯净样本的 EVs。一旦 EVs 被捕获在 Luni 表面上，Luni 洗涤器将进行自动清洗以去除非特异性结合的颗粒，然后使用荧光抗体进行染色，最终通过洗涤器将其干燥，以便在 Leprechaun 上进行分析。利用单颗粒干涉反射成像技术对颗粒进行粒径测量，而荧光显微镜提供 EV 表型和载荷含量的信息。

在这个实验中，我们使用带有内源性 GFP 的 EV 标准品 (Sigma-Aldrich) 进行分析，并添加荧光标记的 anti-CD81-CF555 以确认四跨膜蛋白的表达。EV 标准品在试剂盒提供的孵育液 (Unchained Labs) 中以 1:25 稀释，并在 Luni 上孵育 1 小时后进行清洗和染色。数据在 Leprechaun Exosome Analysis 软件 (Unchained Labs) 中进行分析，通过共定位分析确定 GFP 标记的四跨膜蛋白阳性颗粒的数量。

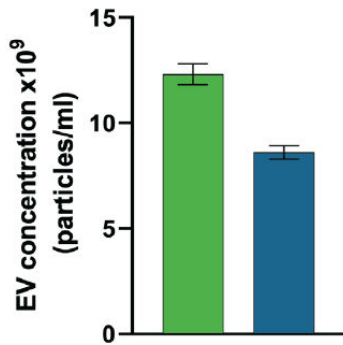
## Leprechaun vs ExoView R200

Leprechaun 的最大进步之一是能够检测到粒径小至 35 nm 的 EVs，因此在 ExoView R200 中无法被测量和统计的颗粒现在可以被观察到。两台仪器都利用单颗粒干涉技术测量在 Luni 表面捕获的个体囊泡的直径。Luni 的二氧化硅表面增强了表面反射光与被捕获 EV 散射光的相干涉<sup>®</sup>。升级换代的光学系统和优化后的背景扣除使 Leprechaun 能够将颗粒粒径测量的下限从 50 nm (R200) 降低到 35 nm。

图 2A 显示了由两个平台确定的样本中 EVs 的总浓度。此案例中，四跨膜蛋白阳性颗粒被定义为 EV，其在各平台的粒径检测范围内测得直径，可能表达或不表达 GFP。Leprechaun 和 ExoView 在荧光通道的配置、功率或灵敏度方面没有区别，这意味着荧光检测不会影响测得的 EV 浓度的差异。

亚群分析显示，尽管两个平台之间的 GFP 阳性 EV 浓度相当 ( $6.5 \times 10^9$  particles/ml)，但 ExoView 检测到的 GFP 阴性 EV 明显较少 (占总 CD81+ EVs 的 27%)，而 Leprechaun 检测到的 GFP 阴性 EV 占比更高 (45%) (图 2B)。

A



B

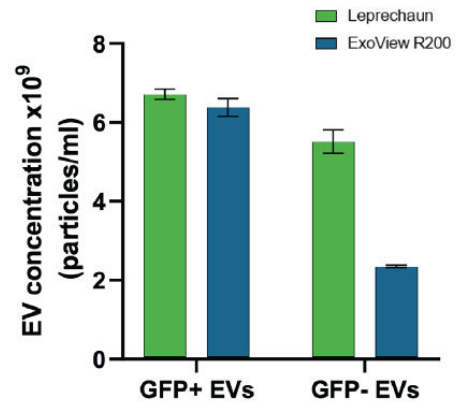
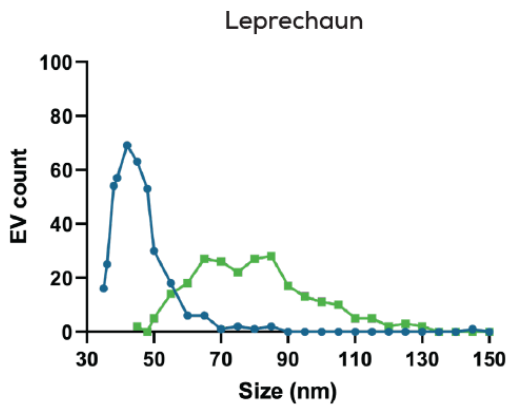


图 2: (A) 由 Leprechaun 和 ExoView R200 确定的总 EV 浓度。(B) 每个平台计算的 GFP 阳性和 GFP 阴性 EV 浓度的比较。以上二图中, n=3, 误差棒表示标准偏差, 绿色柱=Leprechaun, 蓝色柱= ExoView R200

两台仪器上进行的颗粒粒径分析显示, GFP 阳性和阴性群体具有不同的粒径分布 (图 3A 和 3B)。在两个平台上, GFP 阳性 EVs 的平均直径读数为 82 nm, 而 GFP 阴性 EVs 的直径则低于 60 nm。尽管 GFP 阳性 EVs 的粒径峰值在 ExoView 的 50–200 nm 范围内, 但较小的 GFP 阴性 EVs 中有相当比例的颗粒低于 50 nm 的检测下限。

A



B

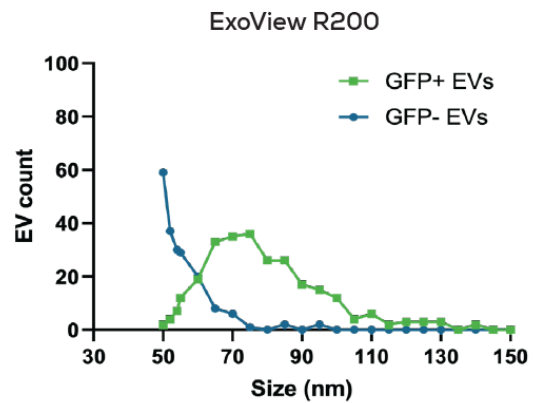


图 3: 在 Leprechaun (A) 和 ExoView R200 (B) 上获取的 GFP 阳性和 GFP 阴性 EVs 的粒径分布。以上二图中, 绿线表示 GFP 阳性 EVs, 蓝线表示 GFP 阴性 EVs

Leprechaun 能够探测和测量小于 50 nm 的颗粒, 这意味着可以获得 GFP 阴性群体粒径的真实均值和众数 (表 1)。这些小型 EVs 解释了 Leprechaun 和 ExoView 之间总 EV 浓度的差异 (图 2A)。根据 Leprechaun 的颗粒计数, 61% 的 GFP 阴性 EVs 小于 50 nm, 相当于  $3.35 \times 10^9$  particles/ml。这个数值与 ExoView ( $2.33 \times 10^9$ ) 和 Leprechaun ( $5.50 \times 10^9$ ) 之间 GFP 阴性 EV 浓度的差异相匹配。

	Leprechaun		ExoView R200	
	Mean (nm)	Mode (nm)	Mean (nm)	Mode (nm)
GFP+ EVs	82	72	82	75
GFP- EVs	48	42	58	50

表 1: Leprechaun 和 ExoView R200 上 GFP 亚群的均值和众数对比

EV 标准品的滴定展示了 Leprechaun 读数高度线性的特性 (图 4)。可以从粗制或纯净样本中确定 EV 浓度, 下限低到  $5 \times 10^6$  particles/ml。

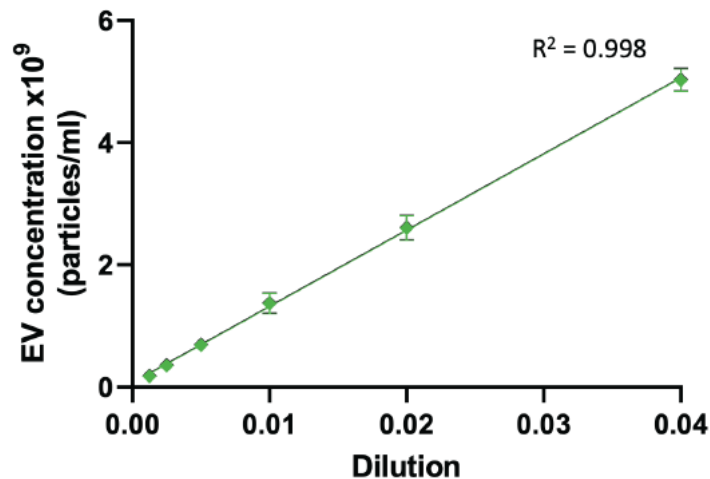


图 4: Leprechaun 上 EV 浓度读数与梯度稀释的线性关系。N = 3, 显示均值, 误差棒表示标准偏差

## 结论

人们越来越认识到 EVs 的多样性不仅在于表面标记物的表达, 还在于囊泡的大小。2018 年发现的外泌颗粒强调了粒径较小囊泡的高丰度<sup>®</sup>。然而, 大多数分析工具难以探测和测量直径小于 50 nm 的生物颗粒, 因此无法提供关于这一颗粒群体的信息, 导致 EV 样品的表征不准确。

Leprechaun 在单颗粒基础上进行粒径和表型分析, 为您的 EV 样品提供更全面的信息。在其前身 ExoView R200 的技术基础上, Leprechaun 提供了 EV 浓度、大小、表面标记物表型和载荷检测, 无需样本纯化。无论您的 EV 群体多么罕见或微小, Leprechaun 都可以为您提供详细信息。

## 参考文献

1. Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. Sodar, B et al. Scientific Reports, 2016. 6:24316.
2. Digital detection of exosomes by interferometric imaging. Daaboul, G et al. Scientific Reports, 2016.6:37426.
3. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. Zhang, H et al. Nature Cell Biology, 2018. 332–343.



**Unchained Labs**  
6870 Koll Center Parkway  
Pleasanton, CA 94566  
Phone: 1925.587.9800  
Toll-free: 1800.815.6384  
Email: [info@unchainedlabs.com](mailto:info@unchainedlabs.com)

© 2023 Unchained Labs. All rights reserved. Unchained Labs is a trademark and Unchained Labs is a registered trademark of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.

Rev A