



Protokol 02b/2025: Izolácia a molekulárno-biologická analýza extracelulárnych vezikúl z vajíčkovodov - oviduktozómov

Izolácia

Krok 1: Klarifikácia vzorky

- **Prenos supernatantu** → Preniesť supernatant z bunkovej kultúry do 50 mL kónickej skúmavky so závitom.
- **Pripojenie Steriflip® filtra** → Do horného otvoreného konca skúmavky naskrutkovať jednotku Steriflip® 0,22 µm membrána Millipore Express (PES) na skúmavku a pevne zaistiť.
- **Obrátenie zostavy** → Prevrátenie skúmavku dnom nahor a jej zabezpečenie v podstavci na skúmavky alebo v stojane.
- **Vákuová filtrácia** → Pripojiť vákuový zdroj k filtračnej jednotke a zapnúť vákuum, aby roztok prešiel membránou do čistej skúmavky.
- **Uskladnenie vzorky** → Odpojiť filter, uzavrieť skúmavku a uskladniť pri 4°C alebo pokračovať v obohacovaní vezikúl.

Uvedený protokol odstredivej ultrafiltrácie je založený na spracovaní 15 ml vzorky (maximálny objem) pomocou filtra AU-15 (10 kDa MWCO). Ak sa majú použiť iné objemy alebo formáty zariadenia (AU-0,5, -2 alebo -4 ml), prečítajte si príslušnú používateľskú príručku filtra Amicon® Ultra.

Krok 2: Ekvilibrácia filtračného zariadenia

- **Pridanie PBS** → Do filtračného zariadenia pridať 2 mL PBS, uzavrieť a centrifugovať pri 4 000 x g počas 10 minút v kyvadlovom rotore (swinging bucket rotor).

Pre AU-2 a 4 sa môže použiť rovnaká rýchlosť odstred'ovania. Ak sa má použiť pevný rotor, príslušné obmedzenia rýchlosti a objemu nájdete v používateľskej príručke k zariadeniu.

V prípade AU-0,5 sa vzorky odstred'ujú pri rýchlosti 14 000 x g v pevnom rotore, do ktorého sa zmestia 1,5 ml skúmavky.

- **Odstránenie PBS** → Odstrániť nefiltrovaný PBS z dna zariadenia pomocou pipety. Aspirovať filtrát zo zbernej skúmavky.



V prípade zariadení AU-2, 4 a 15 odstráňte filtrát vložením pipety (p200) do spodnej časti filtračného zariadenia a odoberte vzorku pohybom zo strany na stranu, aby ste zabezpečili úplné odstránenie.

Pri AU-0.5 zariadení použite reverznú centrifugáciu pri **1 000 x g** na 2 minúty. Pred pokračovaním odsať PBS zo zbernej skúmavky alebo pripojte čistú mikrocentrifúgovú skúmavku.

Krok 3: Ultrafiltrácia vzorky (Koncentrácia a výmena pufru)

- **Pridanie vzorky** → Do filtračného zariadenia AU-15 pridať **15 mL vzorky** a uzavrieť.
- **Centrifugácia** → Centrifugovať pri **4 000 x g** počas **30 minút**. Výsledkom bude koncentrovaný roztok (približne **500 µL – 30 násobná koncentrácia**).

Poznámka: V závislosti od povahy vzorky sa však prietoková rýchlosť, a teda aj čas centrifugácie potrebný na dosiahnutie požadovanej koncentrácie, môže líšiť. Odhady spracovania menších objemov nájdete v jednotlivých používateľských príručkách k filtrom Amicon® Ultra.

- **Výmena pufru** → Vybrať zariadenie z centrifúgy a vyprázdniť zbernú skúmavku. Do filtračného zariadenia pridať **14 mL PBS**, jemne premiešať niekoľkokrát pipetou a znova centrifugovať pri **4 000 x g** na 30 minút.
- **Obnova koncentrovanej vzorky** → Z filtračného zariadenia odobrať koncentrovanú vzorku.
- V prípade zariadení AU-2, -4 a -15 vložiť pipetátor (p200), odobrať objem vzorky (200 µl) a niekoľkokrát premyť bočné steny membrány (3 - 4 na každej strane), aby sa zabezpečila úplná regenerácia. Obnoviť objem vzorky zo základne filtračného zariadenia.
- Pri AU-0.5 umiestniť filter hore dnom v čistej mikrocentrifugačnej skúmavke a vykonať reverznú centrifugáciu pri **2 000 x g** na 1 minútu.

Molekulárno-biologická analýza

1. Nanosight Pro
2. TEM
3. Prietoková cytometria
4. Charakterizácia tetraspanínov: CD9, CD63, CD81, GAPDH, Argonaute-2 (Ago2), Calreticulin (CALR), Flotillin-1 (FLOT-1), Syntenin 1 (Syn-1), TSG101



6. rozbíjanie vyizolovaných častíc a následná izolácia proteínov pomocou Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit

7. Analýza cytokínov v izolovaných exozómoch: IFN- α 2, IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, MCP-1, RANTES, TNF- α pomocou MILLIPLEX Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A + Analýza ďalších markerov: EV markery: CD9, CD63, CD81, TSG101, Syntenin-1, Flotillin-1; Reprodukčné faktory: FSH, LH, Estradiol, Progesterón, IGF-I, IGF-II, HGF, BDNF, VEGF (A,C,D); Imunitné proteíny: IL-6, IL-10, IL-1 β , IL-8, TNF- α , TGF- β 1-3, HSP70; Signalizačné dráhy: Akt/PKB (Ser473), mTOR (Ser2448), p38/SAPK2, ERK1/2 (Thr185/Tyr187), eIF4E (Ser209), PTEN (Ser380); Matrixové proteíny: MMP-2, MMP-9, Osteopontín, Fibronectin, Collagen IV