

Abstrakt

Extracelulární vezikuly (exozomy) jsou předmětem současného nefrologického proteomického výzkumu, neboť se považují za možný zdroj potenciální biomarkerů onemocnění ledvin. Tato práce se zabývá hledáním nejvhodnějšího postupu izolace exozomů z moči. Byly porovnány již popsané metody založené na odlišných fyzikálně-chemických principech izolace: hydrostatická filtrační dialýza (HFD), diferenciální ultracentrifugace, ultrafiltrace přes 100 kDa filtr, nebo srážení vzorku komerční sadou Total Exosome Isolation (from urine). Charakterizace jednotlivých izolovaných exozomálních frakcí byla provedena pomocí metod SDS-PAGE (zhodnocení přítomnosti kontaminujících proteinů), western blot analýzy (detekce exozomálních markerů TSG101, alix), analýzy trajektorie pohybu nanočástic (NTA, velikost a koncentrace vezikul), nebo transmisní elektronové mikroskopie (TEM, morfologie vezikul).

Kvůli přítomnosti kontaminujících proteinů ve vzorcích moči, které by mohly zkreslovat výsledky následných proteomických analýz, byly optimalizovány podmínky štěpení nežádoucích proteinů proteinázou K před vlastními izolacemi.

Bylo zjištěno, že největší výtěžnost a čistotu izolovaných exozomálních frakcí poskytuje postup kombinující HFD s diferenciální ultracentrifugací po předchozí inkubaci s optimálním množstvím proteinázy K.