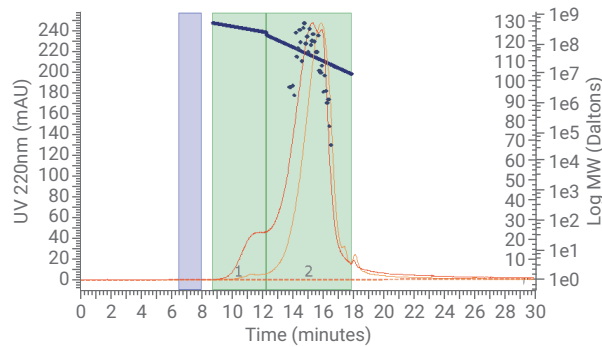


## Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템과 Bio-MDS를 이용한 세포밖 소포체의 Rh(Hydrodynamic Radius) 확인



### 저자

유재영  
한국애질런트테크놀로지스 (주)

### 개요

엑소좀은 세포밖 소포체(Extracellular Vesicles, 이하 EV)의 한 종류이며, 단백질, 핵산 등을 전달하는 매개체로서, 약물을 표적기관에 전달하기 위한 수단으로도 활용됩니다. 엑소좀은 40 ~ 160nm 크기를 보이며 엑소좀 이외의 물질과 구분하기 위하여 크기를 확인하는 것은 중요한 품질관리 요소 중 하나입니다.

Bio-MDS(Multi-detector suite)는 Static light scattering(SLS)과 dynamic light scattering(DLS)의 측정을 지원하며, 크기 배제 크로마토그래피와 함께 사용하여 높은 신뢰성을 보여줍니다. 이를 통하여 생물 유래 거대 입자의 크기 분포에 대한 정보와 Rh(Hydrodynamic radius)를 확인할 수 있습니다.

본 응용에서는 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템과 Bio-MDS를 이용하여 엑소좀의 Rh를 확인하였으며, Rh의 상대 표준편차가 2% 이내로 확인되었습니다. 또한, 90°의 각도에서 측정된 SLS 결과는 엑소좀에 대해 UV 검출기 대비 높은 감도를 보여주었습니다.

## 서론

세포밖 소포체(EV)는 체내 항상성을 유지하기 위해 배출되는 세포에서 유래한 소포체로, 단백질, 핵산, 지질 등 세포 내 다양한 물질을 포함하고 있습니다. 배출 방법에 따라 Ectosome과 엑소좀으로 분류하며, 이 중 엑소좀은 40 ~ 160nm의 크기를 갖는 것으로 보고되고 있습니다. 엑소좀은 화장품과 의약품 등 다양한 용도로 활용되고 있고, naïve 엑소좀의 활용을 시작으로 최근 엑소좀에 약물을 탑재하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있습니다. 엑소좀은 인공으로 제조된 지질 나노입자에 비해 생체 친화적일 뿐만 아니라, 기원 세포의 종류에 따라 표적 기관을 지정할 수 있다는 장점을 가지고 있어, 항암제와 같은 독성이 높은 의약품을 표적 기관에 전달하기 위한 약물 수송체로의 활용도 연구되고 있습니다.

엑소좀은 모세포, 단백질, microvesicle 등 세포 유래의 물질로부터 정제하여 naïve 엑소좀 그대로, 또는 약물 수송체로서 활용됩니다. 정제 과정 및 제품에서 엑소좀의 크기와 양을 측정하는 것은 품질관리에 중요한 요소 중 하나이며, 주로 개별 입자의 브라운운동을 모니터링하는 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) 방법이 활용되고 있습니다. 하지만 속련도에 따라 결과가 달라지고, 분석에 필요한 시료 요구량이 많은 등 신뢰성과 사용 편의성에 어려움이 있습니다. 반면, 동적 광산란(DLS)은 입자의 브라운운동이 반영하는 ACF(Autocorrelation function)를 통해 수집하고 푸리에 변환을 거쳐 Rh를 측정하는 원리로, bubble, 불순물에 의해 간섭 받기 쉬우며, 2종 이상의 분산 시료(Bimodal)를 측정할 경우 2배 이상의 크기 차이를 보이지 않으면 분리된 결과를 얻을 수 없다는 단점을 가지고 있습니다.

크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 분석물질의 크기에 따라 분리할 수 있는 기술입니다. 엑소좀의 SEC 분석에 있어, 시료에 혼합되어 있는 막단백질 이외의 수용성 단백질 등의 다른 불순물과 엑소좀간에는 크기의 차이를 이용하여 SEC로 분리가 가능하며, 엑소좀의 크기에 따른 크로마토그램을 확인함으로써 대략적인 엑소좀의 특성을 이해하는 데에 도움이 됩니다. 하지만, 엑소좀은 기원에 따라 다양한 단백질, 지질의 조성을 가지고 있어 물리화학적으로 다른 특성을 나타내고, SEC 컬럼과의 예기치 않은 상호작용을 초래할 수 있으므로 SEC에서의 용리 시간과 크기의 상관관계가 왜곡될 수 있습니다. 따라서, 엑소좀의 크기를 확인하기 위해 DLS를 검출기로 활용함으로써 결과에 대한 신뢰도를 높이는 것이 필요합니다. 더불어, UV 검출기의 신호는 발색단(Chromophore)의 영향을 받으므로, UV 검출기에서 얻은 면적값에는 엑소좀의 개별 시료에 대한 흡광의 광학적 특성이 반영되어, 특성이 다른 엑소좀의 정량이 어려운 반면, DLS는 발색단으로부터 자유로운 광산란을 이용하므로 기원이 다른 엑소좀을 정량하는 것이 가능합니다.

본 응용에서는 크기 배제 크로마토그래피 시스템을 함께 사용함으로써 일반적인 DLS의 단점인 bubble, 불순물의 간섭을 배제하였으며, SEC를 통해 bimodal, multimodal의 다분산성을 가진 시료를 분리하여 분석함으로써 결과의 신뢰도를 높였습니다.

또한, 자동시료주입기를 통해 소량의 시료만을 주입함으로써 시료의 소모량을 줄이고 정밀성을 높였습니다. 엑소좀과 컬럼 간의 상호작용을 최소화하기 위해 높은 농도의 버퍼를 이동상으로 활용했고, 시료와 시스템의 상호작용, 높은 염 농도의 이동상 사용을 고려하여 1290 Infinity II Bio LC 시스템을 활용하였습니다.

## 실험

### 표준물질 및 시약

Sodium phosphate dibasic heptahydrate와 sodium phosphate monobasic, bovine serum albumin은 Sigma-Aldrich에서 구매하였고, sodium chloride는 Merck에서 구매했습니다. 엑소좀 표준품(HEK293 cell line,  $>1 \times 10^{10}$  particles/vial)은 Novus에서 구매했습니다.

### 분석 기기

- Agilent 1290 Infinity II Bio Flexible 펌프(G7131A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Multisampler(G7137A) 시료 온도 조절 장치 포함
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도조절장치(G7116B) Bio standard flow heat exchanger 포함
- Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기(G7114B) Bio Standard Flow Cell(G1314-60188) 포함
- Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Suite(G7805A) 1260 Infinity Bio-inert 이중 각도 및 동적 광산란 검출기(G7809A) 포함

### 컬럼

Agilent Bio SEC-5 5 $\mu$ m, 2000Å, 7.8 x 300mm(P/N 5190-2541)

### 소프트웨어

Agilent Bio-SEC 소프트웨어 버전 A. 02.01

### 이동상 및 시료 조제방법

이동상은 Sodium phosphate dibasic heptahydrate 34.58g, sodium phosphate monobasic 2.47g, sodium chloride 17.53g을 HPLC 등급 탈이온수에 녹여 0.2um RC filter에 3번 반복 여과하여 조제하였습니다.

Bovine serum albumin(BSA)은 이동상에 녹여 20mg/mL로 하고, 0.2um Captiva Premium Syringe Filter, Regenerated cellulose membrane (P/N 5190-5106)으로 여과했고, 엑소좀 표준품은 탈이온수 100 $\mu$ L를 넣어 녹여 1mg/mL( $>1 \times 10^{11}$  particles/mL)로 하여 사용했습니다.

표 1. Agilent HPLC 분석조건.

파라미터	값
이동상	150mM 인산염 완충액 pH 7.4 + 300mM Sodium chloride
유속	0.6mL/min
분석시간	60분
주입량	20µL
샘플러 온도	4°C
컬럼 온도	40°C
VWD	220nm
LS	40°C, 1Hz

표 2. DLS 분석조건.

파라미터	값
Correlator 실행 시간 (Correlator run time)	5.0s
Correlator 기능 클립 시간 (Correlator function clip time)	10µs
R2	0.80
용액 점도 (Eluent viscosity)	0.00065 P (표준품을 기준으로 조정)
용액 굴절률 (Eluent refractive)	1.333

## 결과

### 크로마토그램

엑소솜과 컬럼간의 상호작용을 최소화하기 위하여 150mM 인산염 완충액 + 300mM sodium chloride 조성을 이동상으로 사용하여왔습니다. 낮은 염 농도의 버퍼는 상호작용으로 인한 피크 끌림이, 높은 염 농도의 버퍼는 분석물질의 구조적 변형을 초래할 수 있어, 이를 고려하여 이동상의 농도를 설정하였으며, 피크 끌림으로 인한 주입간 간섭을 최소화 하기 위하여 분석시간을 60분으로 설정하였습니다. 시험 결과, 20mg/mL 농도의 BSA와 1mg/mL 농도의 엑소솜 표준품을 220nm UV와 90° 각도의 광산란으로 SEC 크로마토그램을 확인했을 때, 엑소솜은 BSA에 비해 UV에서 낮은 피크 높이를 보였으나, LS 90°에서 높은 피크 높이를 보였습니다(그림 1).

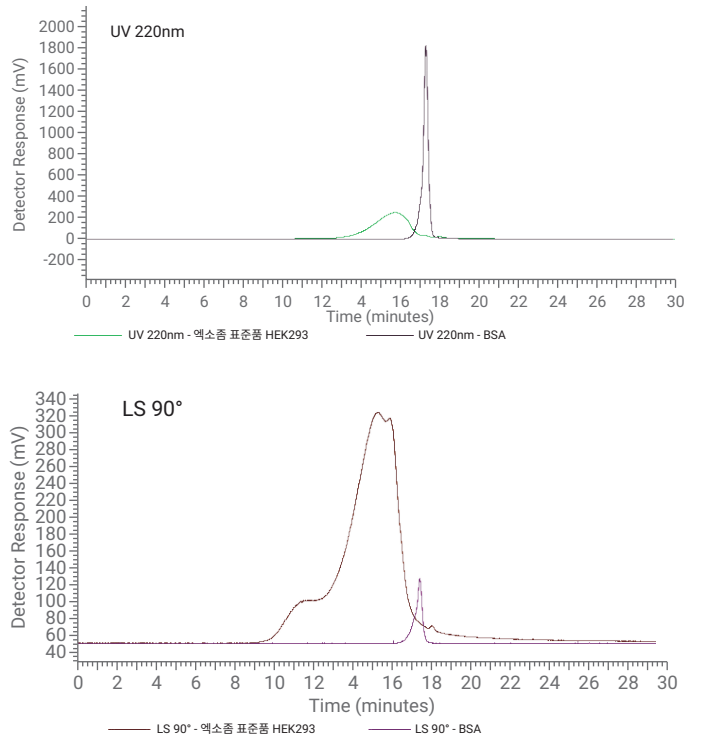


그림 1. BSA와 엑소솜 표준품의 UV 220nm, LS 90° 크로마토그램.

### 엑소솜 표준품의 Rh 확인

시료 분석 이후, DLS가 의도한 측정 값을 나타내도록 파라미터를 조정해야 하며, 비슷한 특성을 가진 표준품을 사용하는 것이 바람직합니다. 엑소솜의 Rh를 확인하기 위하여 Rh 결과가 엑소솜 표준품의 크기와 일치하도록 Eluent viscosity를 0.00065P로 설정하였습니다. 엑소솜의 주피크(Peak 2)의 Rh는 67nm부터 130nm까지 확인되었으며, 평균 약 110nm로 측정되었습니다.(그림 2).

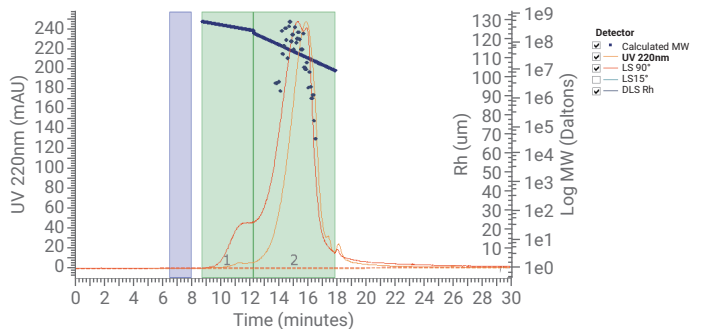


그림 2. 엑소솜 표준품의 LS 90°, UV 220nm 크로마토그램과 Rh 측정 결과.

### LS 및 DLS의 반복성 확인

엑소좀 표준액 20 $\mu$ L를 3회 주입하여 Peak 2에 대한 LS 90°, UV에서의 피크 면적값과 Rh를 확인하였습니다. Rh의 상대 표준편차는 1.86%, LS 90°의 면적에 대한 상대 표준편차는 3.48%, UV 220nm에서의 면적에 대한 상대 표준편차는 2.00%로 좋은 반복성이 확인되었습니다. (표 3).

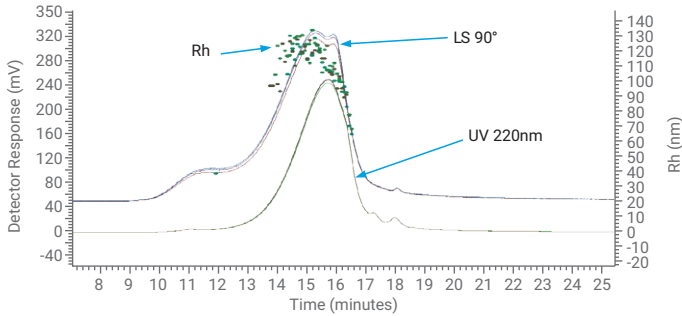


그림 3. 엑소좀 표준품의 반복성 크로마토그램.

표 3. 엑소좀 표준품의 반복성 시험 결과.

	평균 Rh(nm)	LS 90° 면적	UV 220nm 면적
1	108.56	43747.413	31735.621
2	109.30	46176.566	32780.112
3	112.41	46724.271	32927.401
Mean	110.09	45549.417	32481.045
%RSD	1.86	3.48	2.00

### 결론 및 고찰

Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템과 Bio-MDS를 이용해 엑소좀 표준품을 분석했을 때, 측정된 평균 Rh는 110nm로 확인되었습니다. Rh의 반복시험에 대한 상대 표준편차는 1.86%로 확인되었고, 1 $\times$ 10<sup>11</sup> particles/mL의 농도에서도 높은 감도의 LS 90°의 신호를 보여주었습니다. 종합적으로, Bio-MDS는 100nm 내외의 큰 크기를 가진 바이오 시료를 분석하기에 탁월한 성능을 보이는 것이 확인되었습니다.

### 참고 문헌

1. Sonja, S. Determination of Protein Molecular Weight and Size Using the Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution with Advanced Light Scattering Detection. Agilent Technologies application note, publication number 5991-3955EN, 2014.
2. Song, Y. Et al. The emerging role of exosome as novel therapeutics: Biology, technologies, clinical applications, and the nest. American Journal of Reproductive Immunology, 2021.
3. Paghu, K., Valerie, S. L., The biology, function, and biomedical applications of exosomes. Science, 2020.
4. Jamting, A.K., Et al. Systematic study of bimodal suspensions of latex nanoparticles using dynamic light scattering. Advanced Power Technology, 2011.
5. Karim, S., Patience, O. Obi, Ayesha, S., A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? International Journal of Molecular Sciences, 2020.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

DE08999568

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2023  
2023년 6월 22일, 한국에서 발행  
5994-5977KOKR

한국애질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,  
A+ 에셋타워 9층, 06621  
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)  
팩스: 82-2-3452-2451  
이메일: [korea-inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)

