

(90 × 210mm Size)

Code No. 293-77601 (10 purifications)
299-77603 (2 purifications)



For Genetic Research
MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS

【Introduction】

Exosomes and other extracellular vesicles (EVs) are small membrane vesicles containing protein, mRNA, microRNA, DNA, and lipids, which are secreted by various cells and are stable in body fluids including blood, saliva, urine, cerebrospinal fluid (CSF) and breast milk. These EVs have been recognized as messengers of cell-to-cell communication, and biomarkers for various diseases. Conventionally, ultracentrifugation, affinity purification using antibody to surface antigen, and precipitation with polymer reagents are used for isolation of exosomes. However, these methods are not fully satisfying in all performances criteria such as recovery efficiency, purity and operability.

MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS adopts a novel affinity purification method using magnetic beads and phosphatidylserine (PS)-binding protein (PS affinity method). This kit can easily isolate high purity exosomes and other EVs from cell culture medium and body fluids at high yield by a normal microcentrifuge. If higher purity exosomes are needed, please use the 10,000 × g supernatant as sample. This kit enables the isolation of exosomes and other EVs as intact forms because the captured EVs are eluted from magnetic beads with metal-chelating reagent at neutral pH. The isolated intact exosomes and other EVs can be used for various applications including electron microscopic analysis, nanoparticle tracking analysis, administration of EVs and analysis of molecular constituents such as proteins, lipids, or nucleic acids.

【Features】

- High purity exosomes and other EVs are isolated by a novel affinity purification method (PS affinity method).
- The purity and yield of exosomes are higher than ultracentrifugation.
- This kit enables the purification of exosomes and other EVs as intact forms, and can be used for various applications.
- Exosomes can be isolated with magnetic beads.
- No ultracentrifugation is required.

【Kit contents】

This kit includes 7 components.

· 2 purifications

- | | |
|---|----------------------|
| (1) Streptavidin Magnetic Beads | 120 μ L × 1 tube |
| (2) Biotin-labeled Exosome Capture | 20 μ L × 1 tube |
| (3) Exosome Capture Immobilizing Buffer | 7 mL × 1 bottle |
| (4) Exosome Binding Enhancer (× 500) | 100 μ L × 1 tube |
| (5) Washing Buffer | 30 mL × 1 bottle |
| (6) Exosome Elution Buffer | 1 mL × 1 bottle |
| (7) Reaction Tubes | 4 tubes |

– 1/20 –

· 10 purifications

- | | |
|---|----------------------|
| (1) Streptavidin Magnetic Beads | 600 μ L × 1 tube |
| (2) Biotin-labeled Exosome Capture | 100 μ L × 1 tube |
| (3) Exosome Capture Immobilizing Buffer | 35 mL × 1 bottle |
| (4) Exosome Binding Enhancer (× 500) | 500 μ L × 1 tube |
| (5) Washing Buffer | 75 mL × 2 bottles |
| (6) Exosome Elution Buffer | 5 mL × 1 bottle |
| (7) Reaction Tubes | 22 tubes |

【Storage】

Store at 2-10 °C

【Additional required materials】

Reagents :

- 1) TBS (As necessary)

Equipment :

- 1) Microcentrifuge (Max > 10,000 × g)
- 2) Vortex mixer
- 3) Tabletop centrifuge
- 4) Magnetic stand
- 5) Rotator or tube mixer
- 6) Micro pipette
- 7) Pipette tip
- 8) Microcentrifuge tube (1.5 mL)
- 9) Centrifuge tube (15 mL) (As necessary)
- 10) Centrifuge tube (50 mL) (As necessary)
- 11) Ultrafiltration unit (Vivaspin6, M. W. cut off : 100K, Code No. VS0641 or Vivaspin20, M. W. cut off : 100K, Code No. VS2041) (As necessary)

【Precaution for use】

1. Equipment

Please use sterile or DNase and RNase free microcentrifuge tubes and pipette tips. We recommend the use of gloves and a mask to avoid contamination of DNase and RNase.

2. Reagents

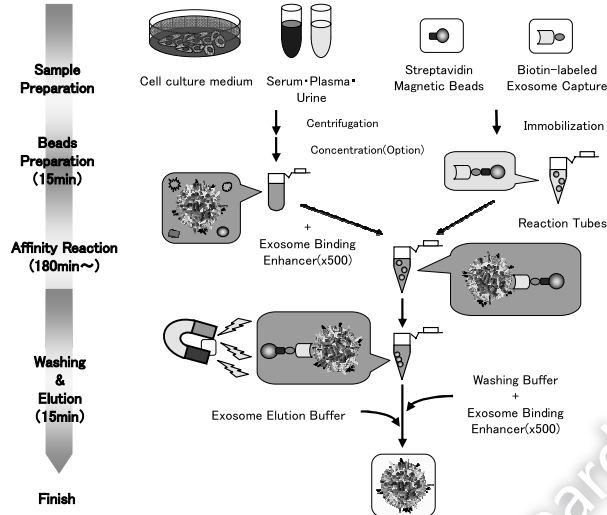
If you analyze the nucleic acid (RNA, DNA) after isolation of exosomes and other EVs, please handle reagents carefully and keep them as sterile as possible. Additionally, if you analyze the mass spectrometry of proteins after isolation of exosomes and other EVs, please be careful of contamination from other proteins.

3. Handling of biohazardous waste

Please treat human serum, human plasma, and human tissue samples as infectious samples. Biohazardous wastes, which include waste liquid and equipment such as microcentrifuge tubes, pipette tips, and gloves, must be disposed of according to the guidelines of the institution.

– 2/20 –

【Outline of procedure】



【Procedure】

1. Preparation of sample

This is the section to prepare samples. When exosomes and other large EVs are needed, prepare **1,200 × g supernatant** as a sample. Additionally, when highly purified exosomes are needed, prepare **10,000 × g supernatant** as a sample. This protocol for sample preparation is set for cell culture medium, serum, and plasma. When other body fluids are used, please examine the appropriate pretreatment protocol by referring to the protocol for serum and plasma.

In the case of cell culture medium

- 1) Culture the cells under the appropriate condition^{※1}.
- 2) Harvest cell culture medium.
- 3) Centrifuge the cell culture medium for 5 minutes at $300 \times g$ and $4^\circ C$ to remove cells and debris.
- 4) Transfer the supernatant from step 3) into a new tube.
- 5) Centrifuge 4) at $1,200 \times g$ for 20 minutes at $4^\circ C$ to remove the cell debris.
- 6) Transfer the supernatant from step 5) into a new tube. (**1,200 × g supernatant**)
- 7) Centrifuge 6) at $10,000 \times g$ for 30 minutes at $4^\circ C$ to remove the large EVs.
- 8) Transfer the supernatant from step 7) into a new tube. (**10,000 × g supernatant**)

【Optional】

If the volume of **1,200 × g supernatant** or **10,000 × g supernatant** is over 1 mL, concentrating the sample by using ultrafiltration unit (Vivaspin6, M. W. cut off: 100K, Code No. VS0641 or Vivaspin20, M. W. cut off: 100K, Code No. VS2041) is recommended. Please concentrate until the sample is less than or equal to 1 mL in accordance with the manufacturer's instruction manual. The maximum sample volume of ultrafiltration treatment is 50 mL (50-fold concentration). Exosomes and other EVs are efficiently recovered from concentrated sample.

※1 Please refer to appropriate culture conditions depending on cell lines. To ensure that isolated exosomes which originate from your cells, please use exosome-depleted FBS. Exosome-depleted FBS is prepared by ultracentrifugation (Example: at $110,000 \times g$ for 18 hours) or is commercially available.

In the case of serum

- 1) Centrifuge the serum at $1,200 \times g$ for 20 minutes at $4^\circ C$ to remove the cell debris.
- 2) Transfer the supernatant from step 1) into a new tube. (**1,200 × g supernatant**^{※2})
- 3) Centrifuge 2) at $10,000 \times g$ for 30 minutes at $4^\circ C$ to remove the large EVs.
- 4) Transfer the supernatant from step 3) into a new tube. (**10,000 × g supernatant**^{※2})

※2 In the case of serum, $1,200 \times g$ supernatant and $10,000 \times g$ supernatant are unsuitable for concentration with ultrafiltration unit.

In the case of plasma

Please prepare as much Washing Buffer as plasma.

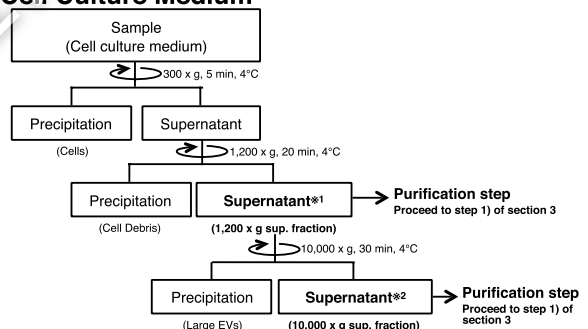
- 1) Centrifuge the plasma at $1,200 \times g$ for 20 minutes at $4^\circ C$ to remove the cell debris.
- 2) Transfer the supernatant from step 1) into a new tube. (**1,200 × g supernatant**^{※3})
- 3) Centrifuge 2) at $10,000 \times g$ for 30 minutes at $4^\circ C$ to remove the large EVs.
- 4) Transfer the supernatant from step 3) into a new tube. (**10,000 × g supernatant**^{※3})
- 5) Add 1:100 volume of Exosome Binding Enhancer ($\times 500$) to Washing Buffer^{※4}.
- 6) Add the same amount of Washing Buffer including Exosome Binding Enhancer ($\times 500$) into a plasma sample from step 2) or step 4).
- 7) Incubate with rotator for 10 minutes at room temperature. **... A sample including Exosome Binding Enhancer ($\times 500$)**
- 8) Proceed to step 2) of section 3.

※3 In the case of plasma, $1,200 \times g$ supernatant and $10,000 \times g$ supernatant are unsuitable for concentration with ultrafiltration unit.

※4 Please adjust the volume of Washing Buffer including Exosome Binding Enhancer ($\times 500$) depending on the volume of plasma sample.

【Flowchart of Sample Preparation (Section 1)】

Cell Culture Medium



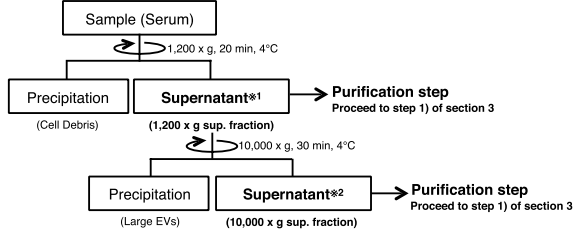
Concentration (Optional)※3

~50 mL (1,200 × g Sup. fraction or 10,000 × g Sup. fraction)

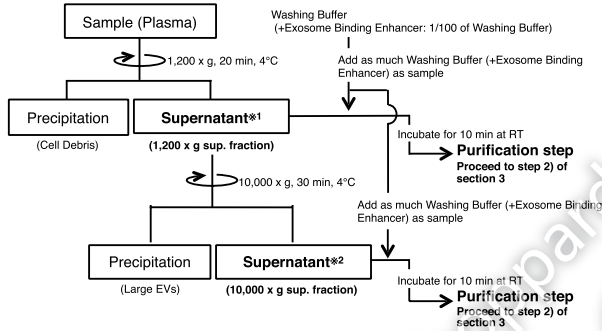
Ultrafiltration and concentration (VivaSpin20, M. W. cut off: 100K)

1 mL → **Purification step**
(~50-fold concentrated)

Serum



Plasma



*1 When **exosomes and large EVs** are needed, use 1,200 × g sup. fraction as sample.

*2 When **exosomes** are needed, use 10,000 × g sup. fraction as sample.

*3 This is optional protocol for large-scale volume (~50 mL) of cell culture medium.

2. Immobilization of Exosome Capture

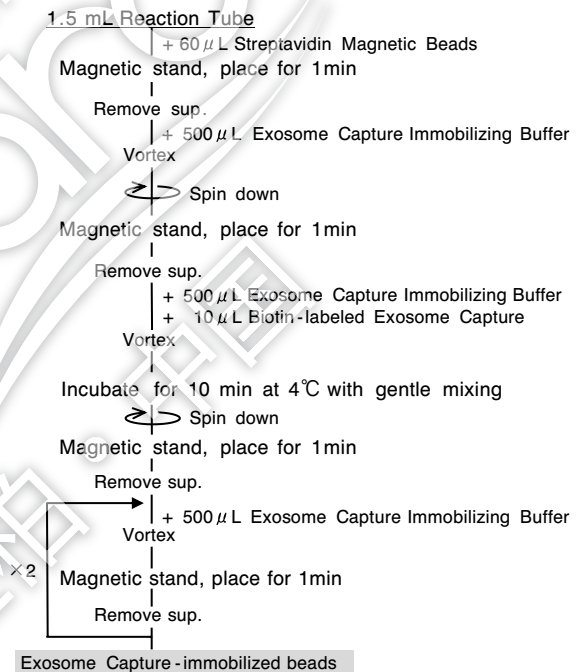
This is the section to immobilize Biotin-labeled Exosome Capture reagent to Streptavidin Magnetic Beads. Please use the 1.5 mL Reaction Tube (included) in the downstream experiment which requires magnetic beads operation^{*5}.

- 1) Transfer 60 μL ^{*6} of Streptavidin Magnetic Beads into a new 1.5 mL Reaction Tube.
- 2) Place the 1.5 mL Reaction Tube on the magnetic stand for 1 minute to collect the beads. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 3) Add 500 μL of Exosome Capture Immobilizing Buffer into the 1.5 mL Reaction Tube from step 2) and suspend it by vortexing.
- 4) Spin down 3), then places it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 5) Add 500 μL of Exosome Capture Immobilizing Buffer and 10 μL of Biotin-labeled Exosome Capture into the 1.5 mL Reaction Tube from step 4) and mix by vortexing.
- 6) Mix for 10 minutes at 2-10 $^{\circ}\text{C}$ with rotator or tube mixer.
- 7) Spin down 6), then places it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.

- 8) Add 500 μL of Exosome Capture Immobilizing Buffer into the 1.5 mL Reaction Tube from step 7) and mix by vortexing.
- 9) Spin down 8), then places it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 10) Repeat steps 8)-9) twice. . . . **Exosome Capture-immobilized beads**

- *5 Please only use the 1.5 mL Reaction Tube included in this kit because only these tubes can generate the high recovery rate of extracellular vesicles by preventing non-specific adsorption of magnetic beads to the tube wall.
- *6 Please adequately suspend the magnetic beads by vortexing. Make sure homogeneous suspension of the magnetic beads is achieved before use.

[Flowchart of immobilization of Exosome Capture (Section 2)]



3. Affinity Reaction

This is the affinity reaction section of the Exosome Capture-immobilized beads with exosomes and other EVs in sample. This protocol is based on the use of 1.5 mL Reaction Tube (max volume : 1 mL). When exosomes and large EVs are needed, use **1,200 × g supernatant** as sample. Additionally, when highly purified exosomes are needed, use **10,000 × g supernatant** as sample.

- 1) Transfer sample (max volume : 1 mL)^{*7} to a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not included in this kit) and add 1:500 volume of Exosome Binding Enhancer (× 500) to sample. Mix by vortexing. . . . **A sample including Exosome Binding Enhancer (× 500)**

- 2) Spin down **A sample including Exosome Binding Enhancer (×500)**, then transfer it into the 1.5 mL Reaction Tube containing **Exosome Capture-immobilized beads**. Mix by vortexing.
- 3) Mix for 3 hours ~ at 2-10 °C with rotator or tube mixer.
- 4) Spin down 3), then places it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant^{*8} after separation of magnetic beads and supernatant. . . . **EVs-binding beads**

[Optional]

When the sample volume is over 1 mL, please refer to the following protocol to use 15 mL centrifuge tube (max volume: 10 mL). However, the increase of sample volume may decrease recovery rate. Therefore, we recommend the use of the Exosome Capture-immobilized beads repeatedly in order to recover extracellular vesicles from used sample (refer to ※16). Please repeat sections 3-5 (up to 4 times). Additionally, in the case of cell culture medium, we recommend a concentration less than or equal to 1 mL by using ultrafiltration unit in accordance with above-described protocol.

- 1) Transfer sample (max volume: 10 mL) to a new 15 mL centrifuge tube^{*9} (not included in this kit) and add 1:500 volume of Exosome Binding Enhancer (×500) to sample. Mix by vortexing. . . . **A sample including Exosome Binding Enhancer (×500)**
- 2) Transfer 1 mL of **A sample including Exosome Binding Enhancer (×500)** into the 1.5 mL Reaction Tube^{*10} containing **Exosome Capture-immobilized beads**. After suspending the beads, transfer all of the beads in suspension back to the 15 mL centrifuge tube. Mix by vortexing.
- 3) Mix for 3 hours ~ at 2-10 °C with rotator or tube mixer.
- 4) Centrifuge 3) at 1,000 × g for 3 minutes at 4 °C.
- 5) Remove the supernatant^{*8} carefully and leave 1ml of the supernatant and bead pellets.
- 6) After suspending sample from step 5), transfer all of the beads in suspension into the 1.5 mL Reaction Tube from 2).
- 7) Spin down 6), then place it on the magnetic stand for 1 minute to collect the beads. Remove the supernatant^{*8} after separation of magnetic beads and supernatant. . . . **EVs-binding beads**

- ※7 Add the appropriate volume of TBS buffer to each sample to reach a volume of 0.5 mL to obtain the better mixture of the Exosome Capture-immobilized beads with sample. (Example : 100-200 μ L→500 μ L)
- ※8 When further recovery of remaining extracellular vesicles is needed, please store the used supernatant.
- ※9 Please use a 15 mL centrifuge tube in which the non-specific adsorption of magnetic beads to the tube wall is low. (Example : Code No. 430791, Corning)
- ※10 Please store this 1.5 mL Reaction Tube after transferring the beads into the 15 mL centrifuge tube, because it is used again at the optional step 6) of section 3.

4. Washing of EVs-binding beads

This is the washing section of **EVs-binding beads**. Please use Washing Buffer after adding Exosome Binding Enhancer (×500) certainly^{*11}.

- 1) Add 1:500 volume of Exosome Binding Enhancer (×500) to the required Washing Buffer^{*12} and mix by vortexing^{*13}.
- 2) Add 1 mL of Washing Buffer (+ Exosome Binding Enhancer (×500)) into the 1.5 mL Reaction Tube containing **EVs-binding beads** and mix by vortexing.
- 3) Spin down 2), then places it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 4) Repeat steps 2)-3) twice.
- 5) Spin down again the 1.5 mL Reaction Tube from step 4), then places it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant completely after separation of magnetic beads and supernatant^{*14}. . . . **Washed EVs-binding beads**

- ※11 If the addition of Exosome Binding Enhancer (×500) to Washing buffer is omitted, captured exosome and EVs will be eluted from the magnetic beads by Washing Buffer during washing section.
- ※12 The required volume of Washing Buffer is 3 mL per reaction.
- ※13 Please prepare Washing Buffer (+ Exosome Binding Enhancer (×500)) just before use, because constituents may be precipitated after the addition of Exosome Binding Enhancer (×500) overtime.
- ※14 Please remove Washing Buffer (+ Exosome Binding Enhancer (×500)) in the tube completely, because remaining buffer causes reduction of elution efficiency of captured exosomes and other EVs.

5. Elution of extracellular vesicles

This is the elution section of extracellular vesicles from **Washed EVs-binding beads**.

- 1) Add 50 μ L of Exosome Elution Buffer into the 1.5 mL Reaction Tube containing **Washed EVs-binding beads** and mix by vortexing^{*15}.
- 2) Spin down 1), then places it on the magnetic stand for 1 minute. Transfer the supernatant into a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not included in this kit) after separation of magnetic beads and supernatant.
- 3) Add 50 μ L of Exosome Elution Buffer into the 1.5 mL Reaction Tube from step 2) again, and mix by vortexing^{*15}.
- 4) Spin down 3), then places it on the magnetic stand for 1 minute. Transfer the supernatant into the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 2) after separation of magnetic beads and supernatant, and then pool together^{*16, 17}. (Total: 100 μ L)

[Optional]

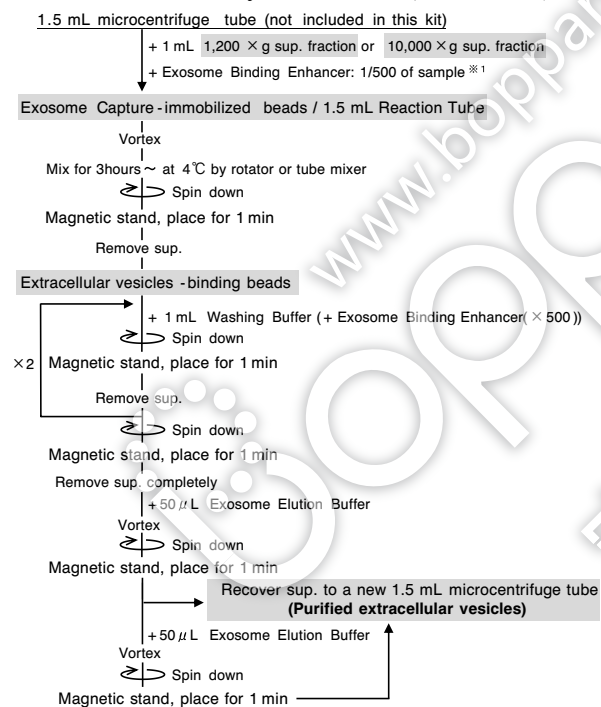
In the case of RNA purification from eluted extracellular vesicles, please add 100 μ L of Exosome Elution Buffer to pooled eluate to prepare 200 μ L of sample in total. Then, extract RNAs from extracellular vesicles with Wako's microRNA Extractor SP Kit (Code No. 295-71701) in accordance with the instruction manual.

※15 When the aggregates of magnetic beads are remaining, please suspend magnetic beads by tapping and/or pipetting until it reaches a uniform consistency.

※16 **Exosome Capture-immobilized beads** are reusable after eluting EVs (up to 4 times). Therefore, when you need to recover more remaining EVs from samples, please repeat the section 3-5 to increase the recovered amount. After recovering the eluate, please add the stored supernatant of section 3 (refer to ※8) into the 1.5 mL Reaction Tube containing **Exosome Capture-immobilized beads** from step 4) of section 5 and repeat the section 3-5 as necessary. This kit includes the required reagents to reuse a maximum of 4 times.

※17 There is a possibility that the pooled eluate have a small amount of magnetic beads. When extracellular vesicles are analyzed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) or electron microscopic analysis, please filter pooled eluate by using 0.45 μm pore size filter unit (Example: Ultrafree[®] MC 0.45 μm, Code No. UFC30HV25, Millipore[®]) before analysis as needed.

[Flowchart of Affinity Purification (Section 3-5)]



※1 In the case of plasma, no need to add the Enhancer again.

【Related Product】

Code No.	Description	Size
295-71701	microRNA Extractor SP Kit	50 reactions
317-90175	10 × TBS (pH 7.4)	500 mL

【Reference】

W. Nakai, *et al.*, *Sci Rep* **6**, 33935 (2016).

Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
 Telephone : + 81-6-6203-3741
 Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

Wako Chemicals USA, Inc.

1600 Bellwood Road
 Richmond, VA 23237
 U.S.A.
 Telephone : + 1-804-271-7677
 Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

Wako Chemicals GmbH

Fuggerstrasse 12
 D-41468 Neuss
 Germany
 Telephone : + 49-2131-311-0
 Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

コード No. 293-77601 (10 回用)
299-77603 (2 回用)

遺伝子研究用

MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS

【はじめに】

エクソソームに代表される細胞外小胞は、表面または内部にタンパク質、mRNA、microRNAなどを含み、細胞から分泌された後、血液、尿、唾液、髄液、母乳などの体液中で安定的に存在していることから、細胞間コミュニケーションのメッセンジャーや疾患のバイオマーカーとして注目を集めています。エクソソームの単離方法として、超遠心分離法、表面抗原に対する抗体を用いたアフィニティー法、ポリマー試薬による沈殿法などが一般的に用いられていますが、回収効率、純度、操作性などすべての点で満足できる方法はありませんでした。

本キットは、ホスファチジルセリン (PS) に結合するタンパク質と磁気ビーズを利用した新規アフィニティー法 (PSアフィニティー法) により、PSを膜表面に有するエクソソームや他の細胞外小胞を高純度かつ高効率で簡便に単離することができます。また、10,000×g 遠心分離を行った上清をサンプルに用いることで、より高純度にエクソソームを取得することができます。さらに、本キットは金属イオン依存的に細胞外小胞を捕捉するため、キレート剤により中性条件下でインタクテナ状態の細胞外小胞を溶出することができ、取得した細胞外小胞を、電子顕微鏡解析、ナノ粒子トラッキング解析、投与実験、構成分子 (タンパク質、脂質、核酸など) の解析など様々なアプリケーションに利用することができます。

【特長】

- 新規アフィニティー法 (PSアフィニティー法) により高純度な細胞外小胞が取得可能
- 従来の超遠心分離法よりも高い収量で高純度なエクソソームが取得可能
- インタクテナ細胞外小胞が取得でき、様々なアプリケーションに利用可能
- 磁気ビーズによる簡便操作
- 超遠心分離が不要

【キット内容】

本キットは7つの構成部材からなります。

・ 2 回用

(1) Streptavidin Magnetic Beads	120 μL × 1本
(2) Biotin-labeled Exosome Capture	20 μL × 1本
(3) Exosome Capture Immobilizing Buffer	7 mL × 1本
(4) Exosome Binding Enhancer (× 500)	100 μL × 1本
(5) Washing Buffer	30 mL × 1本
(6) Exosome Elution Buffer	1 mL × 1本
(7) Reaction Tubes	4本

- 11/20 -

・ 10 回用

(1) Streptavidin Magnetic Beads	600 μL × 1本
(2) Biotin-labeled Exosome Capture	100 μL × 1本
(3) Exosome Capture Immobilizing Buffer	35 mL × 1本
(4) Exosome Binding Enhancer (× 500)	500 μL × 1本
(5) Washing Buffer	75 mL × 2本
(6) Exosome Elution Buffer	5 mL × 1本
(7) Reaction Tubes	22本

【保存条件】

冷蔵 (2~10℃)

【キット以外に準備する物】

試薬:

- 1) TBS (必要に応じて)

器具:

- 1) 冷却式遠心分離機 (Max > 10,000 × g)
- 2) ボルテックスミキサー
- 3) 卓上遠心機
- 4) 磁気スタンド
- 5) 回転式攪拌機 (ローター) またはチューブミキサー
- 6) マイクロピペット
- 7) ピペットチップ
- 8) 1.5 mL容マイクロチューブ
- 9) 15 mL容遠沈管 (必要に応じて)
- 10) 50 mL容遠沈管 (必要に応じて)
- 11) 遠心式限外濃縮ユニット (Sartorius社 Vivaspin6分画分子量100K, Code: VS0641 または Vivaspin20分画分子量100K, Code: VS2041) (必要に応じて)

【操作前の注意点】

1. 器具類

マイクロチューブ、ピペットチップなどはオートクレープ処理または市販のDNase・RNaseフリー製品を使用してください。また、実験中はプラスチック手袋およびマスクを着用し、DNase・RNaseの混入には細心の注意を払ってください。

2. 試薬類

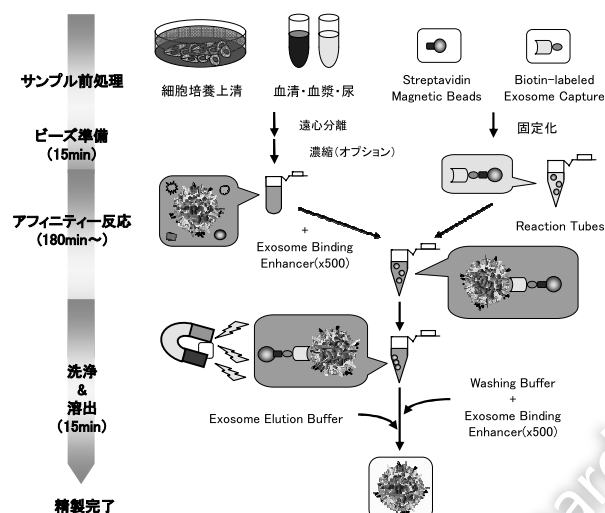
エクソソームや他の細胞外小胞を単離後に核酸 (RNA、DNA) の解析を行う場合には、試薬の取扱いには十分注意し、使用する試薬類は可能な限り無菌状態を保つよう心掛けてください。また単離後にタンパク質の質量分析を行う場合には、タンパク質の混入に十分注意してください。

3. 試料および実験に使用した消耗品の取扱い

ヒト体液サンプル、細胞培養上清サンプルは感染性試料として取扱ってください。また、抽出操作中に発生した廃液、実験に用いたピペットチップやマイクロチューブ等は感染性廃棄物として、所属施設のガイドラインに従って適切に廃棄してください。

- 12/20 -

【操作概要】



【操作】

1. サンプルの準備

本工程はサンプルの前処理ステップです。エクソソームとその他の細胞外小胞（マイクロベジクルなど）を取得したい場合は下記プロトコルに従い **1,200 × g 遠心分離上清画分** を調製してください。またエクソソームをより高純度で取得したい場合は下記プロトコルに従い **10,000 × g 遠心分離上清画分** を調製してください。なお、本サンプル準備プロトコルでは細胞培養上清および血清・血漿サンプルを用いる場合のプロトコルを記載しております。その他の体液サンプルを用いる場合は血清・血漿サンプルのプロトコルを参考に、適宜前処理プロトコルをご検討ください。

細胞培養上清の場合

- 1) 目的の細胞株を適切な条件下で培養する*1。
- 2) 細胞培養液を回収する。
- 3) 細胞培養液を 4℃、300 × g で 5 分間遠心分離する（細胞の分離）。
- 4) 3) の上清を新しいチューブに移す。
- 5) 4℃、1,200 × g で 20 分間遠心分離する（細胞断片の分離）。
- 6) 5) の上清を新しいチューブに移す（**1,200 × g 遠心分離上清画分**）。
- 7) 4℃、10,000 × g で 30 分間遠心分離する（大きいサイズの細胞外小胞の分離）。
- 8) 7) の上清を新しいチューブに移す（**10,000 × g 遠心分離上清画分**）。

【オプション】

使用したい **1,200 × g 遠心分離上清画分** または **10,000 × g 遠心分離上清画分** の容量が 1 mL 以上の場合、遠心式限外濃縮ユニット（Sartorius社 Vivaspin6 分画分子量 100K, Code: VS0641 または Vivaspin20 分画分子量 100K, Code: VS2041）を用いて、メーカープロトコルに従って 1 mL 以下まで限外濃縮することをお奨めします。濃縮できる最大容量は 50 mL（50 倍濃縮）です。サンプルを濃縮することで効率よく細胞外小胞を取得することができます。

※1 培地や培養細胞数などは目的の細胞株に応じて適切な条件をご検討ください。
また培地にウシ胎児血清（FBS）を添加する場合は、超遠心分離処理（例、110,000 × g で 18 時間）などにより細胞外小胞を除去した FBS または市販の細胞外小胞除去 FBS をご使用ください。

血清サンプルの場合

- 1) 血清を 4℃、1,200 × g で 20 分間遠心分離する（細胞断片の分離）。
- 2) 1) の上清を新しいチューブに移す（**1,200 × g 遠心分離上清画分***2）。
- 3) 4℃、10,000 × g で 30 分間遠心分離する（大きいサイズの細胞外小胞の分離）。
- 4) 3) の上清を新しいチューブに移す（**10,000 × g 遠心分離上清画分***2）。

※2 血清サンプルの 1,200 × g 遠心分離上清画分または 10,000 × g 遠心分離上清画分は限外濃縮には適しません。

血漿サンプルの場合

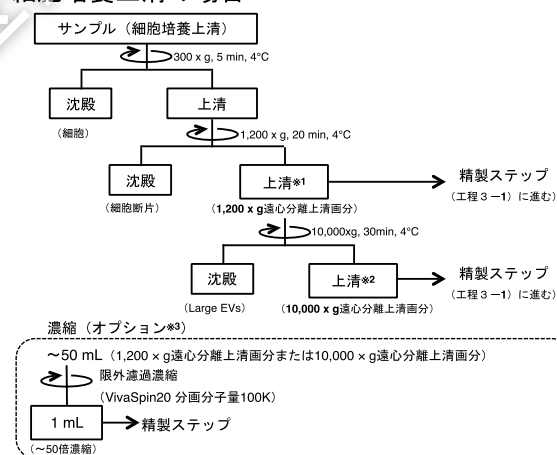
- 血漿サンプルと同量の Washing Buffer をご用意ください。
- 1) 血漿を 4℃、1,200 × g で 20 分間遠心分離する（細胞断片の分離）。
 - 2) 1) の上清を新しいチューブに移す（**1,200 × g 遠心分離上清画分***3）。
 - 3) 4℃、10,000 × g で 30 分間遠心分離する（大きいサイズの細胞外小胞の分離）。
 - 4) 3) の上清を新しいチューブに移す（**10,000 × g 遠心分離上清画分***3）。
 - 5) Washing Buffer に 1/100 容量の Exosome Binding Enhancer (× 500) を添加する*4。
 - 6) 2) または 4) で調製した血漿サンプルに 5) で調液した Washing Buffer（1/100 容量の Exosome Binding Enhancer (× 500) 添加済み）を等量加える。
 - 7) ローテーターにより転倒混和しながら室温 10 分間反応させる。… **Exosome Binding Enhancer (× 500) 添加済みサンプル**
 - 8) 工程 3、アフィニティー反応の 2) に進む。

※3 血漿サンプルの 1,200 × g 遠心分離上清画分または 10,000 × g 遠心分離上清画分は限外濃縮には適しません。

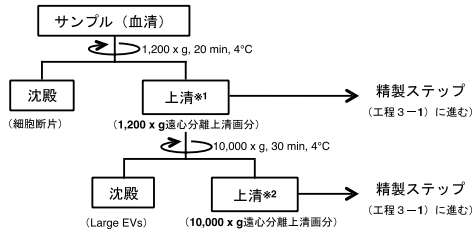
※4 調液する量は血漿サンプル量に合わせて適宜調節してください。

【サンプルの準備フロー（工程 1）】

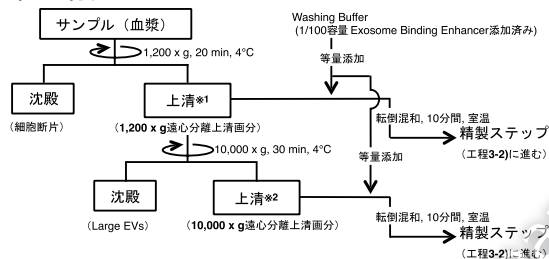
細胞培養上清の場合



血清の場合



血漿の場合



※1 Exosome+Large EVsを取得したい場合には、1,200 x g遠心分離上清画分を精製に使用してください。

※2 Exosomeを取得したい場合には、10,000 x g遠心分離上清画分を精製に使用してください。

※3 濃縮は大容量 (~50 mL) の細胞培養上清から精製する場合のオプションプロトコルです。

2. Exosome Captureの固定化

本工程はBiotin-labeled Exosome CaptureをStreptavidin Magnetic Beadsに固定化する工程です。本工程以降の磁気ビーズ使用操作では必ずキット添付の1.5 mL Reaction Tubeをご使用下さい※5。

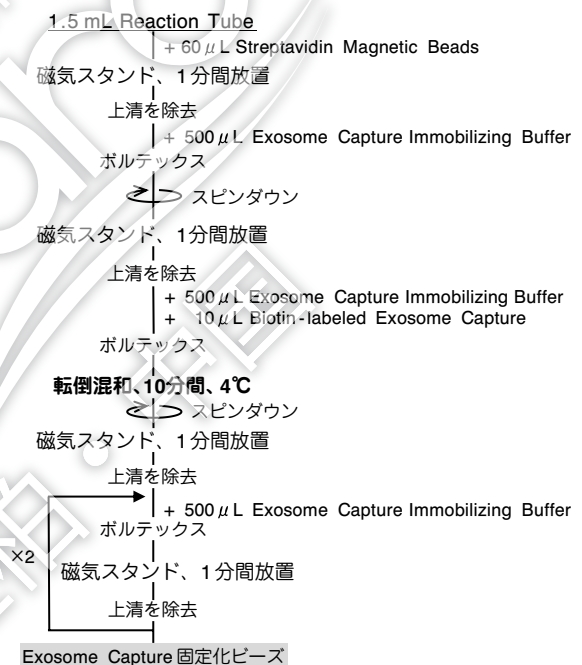
- 1) Streptavidin Magnetic Beads 60 μL ※6を1.5 mL Reaction Tubeに移す。
- 2) 1.5 mL Reaction Tubeを専用磁気スタンドにセットし、約1分間静置し、磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をマイクロピペットで除く。
- 3) Exosome Capture Immobilizing Buffer 500 μL を、2)の1.5 mL Reaction Tubeに添加し、磁気スタンドから取り外してボルテックスミキサーで懸濁する。
- 4) 1.5 mL Reaction Tubeを卓上遠心機でスピンドウンした後、専用磁気スタンドにセットし、約1分間静置する。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をマイクロピペットで除く。
- 5) Exosome Capture Immobilizing Buffer 500 μL とBiotin-labeled Exosome Capture 10 μL を、4)の1.5 mL Reaction Tubeに添加し、磁気スタンドから取り外してボルテックスミキサーで懸濁する。
- 6) 冷蔵 (2~10 $^{\circ}\text{C}$) でローテーター等により転倒混和しながら10分間反応させる。
- 7) 1.5 mL Reaction Tubeを卓上遠心機でスピンドウンした後、専用磁気スタンドにセットし、約1分間静置する。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をマイクロピペットで除く。

- 8) Exosome Capture Immobilizing Buffer 500 μL を、7)の1.5 mL Reaction Tubeに添加し、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 9) 1.5 mL Reaction Tubeを卓上遠心機でスピンドウンした後、専用磁気スタンドにセットし、約1分間静置する。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をマイクロピペットで除く。
- 10) 8)~9)の操作をさらに2回繰り返す。… **Exosome Capture** 固定化ビーズ

※5 キット添付の1.5 mL Reaction Tubeは磁気ビーズのチューブ壁面への吸着が少ない材質を採用しており、ビーズ吸着による回収率低下を抑えることができます。

※6 Streptavidin Magnetic Beadsは使用前にボルテックスミキサーでよく撪拌し、ビーズが均一に懸濁されていることを確認してからご使用ください。

【Exosome Captureの固定化フロー (工程2)】



3. アフィニティー反応

本工程はExosome Capture固定化ビーズとサンプルを反応させる工程です。1.5 mL Reaction Tubeを用いた反応系 (最大容量 1 mL) を基本プロトコルとしています。エクソソームとその他の細胞外小胞 (マイクロベジクルなど) を取得したい場合は **1,200 x g 遠心分離上清画分** を、エクソソームをより高純度で取得したい場合は **10,000 x g 遠心分離上清画分** をサンプルとしてご使用ください。

- 1) サンプル (最大容量 1 mL)※7をキット添付品でない1.5 mL容マイクロチューブに移し、サンプルに対して1/500容量のExosome Binding Enhancer (×500)を添加し、ボルテックスミキサーで混合する。… **Exosome Binding Enhancer (×500)** 添加済みサンプル

- 2) **Exosome Binding Enhancer (×500)** 添加済みサンプルを卓上遠心機でスピンドアウンした後、サンプルを **Exosome Capture** 固定化ビーズの入った 1.5 mL Reaction Tube に移し、ボルテックスミキサーで混合する。
- 3) 冷蔵でローテーターにより転倒混和しながら 3 時間以上反応させる。
- 4) 1.5 mL Reaction Tube を卓上遠心機でスピンドアウンした後、専用磁気スタンドにセットし、約 1 分間静置する。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をマイクロピペットで除く^{※8}。… **細胞外小胞結合ビーズ**

【オプション】

サンプル容量が 1 mL 以上の場合、下記プロトコールに従って 15 mL 容遠沈管を用いた反応系（最大容量 10 mL）で反応を行うことができます。ただしサンプル容量が増えると反応効率が低下するため、3～5 の工程を繰り返して細胞外小胞を回収することをお奨めします（※16 を参照）。また、細胞培養上清サンプルの場合は、限外濾過濃縮により 1 mL 以下まで濃縮後、上記の 1.5 mL マイクロチューブを用いる反応系で反応を行うことをお奨めします。

- 1) サンプル（最大容量 10 mL）をキット添付品でない 15 mL 容遠沈管^{※9}に移し、サンプルに対して 1/500 容量の Exosome Binding Enhancer (×500) を添加し、ボルテックスミキサーで混合する。… **Exosome Binding Enhancer (×500) 添加済みサンプル**
- 2) **Exosome Capture** 固定化ビーズが入った 1.5 mL Reaction Tube^{※10} に、**Exosome Binding Enhancer (×500)** 添加済みサンプル 1 mL を移し、ピペッティングにより懸濁した後、ビーズ懸濁液の全量を再び 15 mL 遠沈管に戻し、ボルテックスミキサーでサンプルと混合する。
- 3) 冷蔵でローテーターにより転倒混和しながら 3 時間以上反応させる。
- 4) 15 mL 容遠沈管を冷却式遠心分離機使用して 1,000 × g で 3 分間遠心分離する。
- 5) 上清を約 1 mL 残して、ビーズの沈殿を吸い込まないように注意しながら上清をピペットで除く^{※8}。
- 6) 5) の 15 mL 容遠沈管に残った約 1 mL の上清とビーズをピペッティングにより懸濁した後、ビーズ懸濁液の全量を 2) の 1.5 mL Reaction Tube に移す。
- 7) 1.5 mL Reaction Tube を卓上遠心機でスピンドアウンした後、専用磁気スタンドにセットし、約 1 分間静置する。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をマイクロピペットで除く^{※8}。… **細胞外小胞結合ビーズ**

※7 サンプル容量が 0.5 mL 未満の場合、Exosome Capture 固定化ビーズとサンプルがローテーターにより上手く攪拌できない場合がある為、必要に応じて TBS Buffer を添加してサンプル量を 0.5 mL 以上にスケールアップしてください（例：100～200 μ L → 500 μ L）。

※8 反応後の上清から未回収の細胞外小胞をさらに回収したい場合は、除いた上清を廃棄せず別の容器に移して保管しておいてください。

※9 磁気ビーズのチューブ壁面への吸着が少ない材質の 15 mL 遠沈管（例：コード No. 430791，コーニング社）を使用してください。

※10 ビーズ懸濁液を移した後の 1.5 mL Reaction Tube は 6) で再び使用するため、廃棄せず保管しておいてください。

4. 細胞外小胞結合ビーズの洗浄

本工程は細胞外小胞結合ビーズを洗浄する工程です。本工程で使用する Washing Buffer は使用前に必ず Exosome Binding Enhancer (×500) を添加してからご使用ください^{※11}。

- 1) 必要量^{※12} の Washing Buffer に対して 1/500 容量の Exosome Binding Enhancer (×500) を添加し、ボルテックスミキサーで混合する^{※13}。
- 2) **細胞外小胞結合ビーズ** が入った 1.5 mL Reaction Tube に Washing Buffer (+ Exosome Binding Enhancer (×500)) 1 mL を添加し、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 3) 1.5 mL Reaction Tube を卓上遠心機でスピンドアウンした後、専用磁気スタンドにセットし、約 1 分間静置する。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をピペットで除く。
- 4) 2)～3) の操作をさらに 2 回繰り返す。
- 5) 1.5 mL Reaction Tube を卓上遠心機でスピンドアウンした後、専用磁気スタンドにセットし、約 1 分間静置する。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清残液をマイクロピペットで完全に除去^{※14}。… **洗浄済み細胞外小胞結合ビーズ**

※11 Exosome Binding Enhancer (×500) を添加していない Washing Buffer を使用すると、ビーズで捕捉した細胞外小胞が洗浄操作で溶出し、回収効率が著しく低下します。

※12 Washing Buffer の必要量の目安は 1 反応あたり 3 mL です。

※13 Exosome Binding Enhancer を添加してから長時間（1 時間以上）経過すると、成分が析出する場合がありますので、必ず使用直前に調製してください。

※14 Washing Buffer (+ Exosome Binding Enhancer (×500)) が 1.5 mL Reaction Tube に残ると溶出効率が低下しますので完全に除去してください。

5. 細胞外小胞の溶出

本工程は、洗浄済み細胞外小胞結合ビーズから細胞外小胞を溶出する工程です。

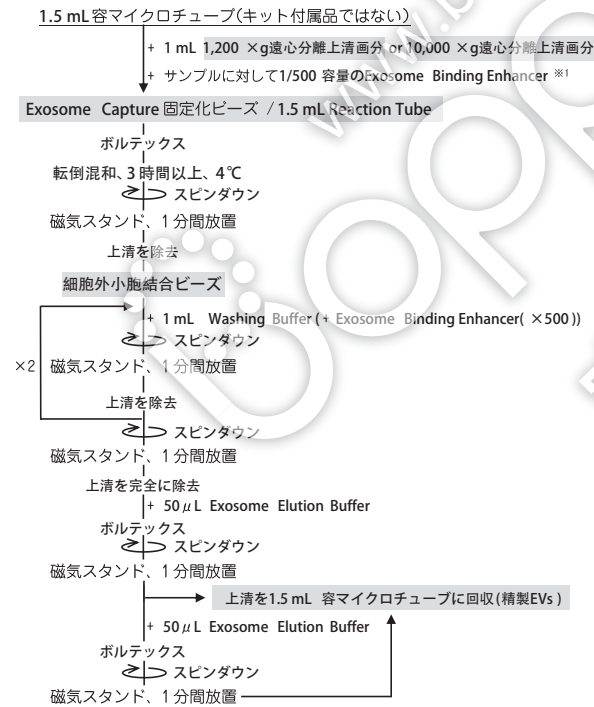
- 1) **洗浄済み細胞外小胞結合ビーズ** が入った 1.5 mL Reaction Tube に Exosome Elution Buffer 50 μ L を添加し、磁気スタンドから取り外してボルテックスミキサーで懸濁する^{※15}。
- 2) 1.5 mL Reaction Tube を卓上遠心機でスピンドアウンした後、専用磁気スタンドにセットし、約 1 分間静置する。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をキット添付品でない新しい 1.5 mL 容マイクロチューブに回収する。
- 3) 2) の磁気ビーズに Exosome Elution Buffer をさらに 50 μ L 添加し、磁気スタンドから取り外してボルテックスミキサーで懸濁する^{※15}。
- 4) 1.5 mL Reaction Tube を卓上遠心機でスピンドアウンした後、専用磁気スタンドにセットし、約 1 分間静置する。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清を 2) の 1.5 mL マイクロチューブに回収しブールする^{※16,17}。

【オプション】

取得した細胞外小胞からRNAを精製したい場合は、上記2)と4)で回収しプールした溶出液100 μLにExosome Elution Buffer 100 μLを添加し、計200 μLの溶液とした後、microRNA Extractor SP Kit (Code : 295-71701) を用いて、取扱説明書に従ってRNA精製を行ってください。

- ※15 磁気ビーズが凝集してボルテックスミキサーだけでは均一に懸濁されない場合は、タッピングまたはピペetting操作を加えながら、ビーズを均一に懸濁して下さい。
- ※16 細胞外小胞を溶出した後のExosome Capture固定化ビーズは再利用(最大4回)することができるため、サンプルに残った細胞外小胞をさらに回収したい場合は、工程3~5のアフィニティー精製を繰り返すことで回収量を増やすことができます。溶出液を回収した後、Exosome Capture固定化ビーズが入った工程5-4)の1.5 mL Reaction Tubeに工程3で別容器に保管しておいた使用後サンプル(※8参照)を添加し、必要に応じて工程3~5を繰り返して下さい。なお、本キットには最大4回再利用するために必要な試薬が用意されています。
- ※17 回収したサンプルには微量の磁気ビーズが混入している可能性があります。細胞外小胞をナノ粒子トラッキング解析や電子顕微鏡解析する際は必要に応じて、0.45 μmフィルター濾過処理(例:コードNo. UFC30HV25, メルクミリポア社)を行った後、その濾液を解析にご使用下さい。

【アフィニティー精製フロー (工程3~5)】



※1 血漿サンプルの場合、再度Enhancerを添加する必要はありません。

【関連製品】

コードNo.	品名	容量
295-71701	マイクロRNAエキストラクター® SPキット	50回用
317-90175	10 × TBS (pH 7.4)	500 mL

【参考文献】

W. Nakai, et al., *Sci Rep* **6**, 33935 (2016).

製造発売元

STUVWXYZ[\]

大阪市中央区道修町3-1-2
電話 (06) 6203-3741 (代表)

1702K03

