

FUJIFILM**Wako**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 μL × 1 tube |
| (2) Biotin-labeled Exosome Capture | 20 μL × 1 tube |
| (3) Exosome Capture Immobilizing Buffer | 7 mL × 1 bottle |
| (4) Exosome Binding Enhancer (× 500) | 100 μL × 1 tube |
| (5) Washing Buffer | 30 mL × 1 bottle |
| (6) Exosome Elution Buffer | 1 mL × 1 bottle |
| (7) Reaction Tubes | 4 tubes |

- 1/24 -

· 10 purifications

- | | |
|---|-------------------|
| (1) Streptavidin Magnetic Beads | 600 μL × 1 tube |
| (2) Biotin-labeled Exosome Capture | 100 μL × 1 tube |
| (3) Exosome Capture Immobilizing Buffer | 35 mL × 1 bottle |
| (4) Exosome Binding Enhancer (× 500) | 500 μL × 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

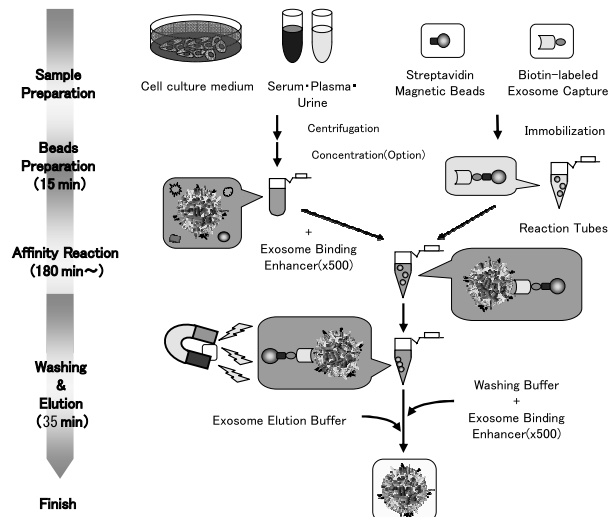
If you analyze the nucleic acid (RNA, DNA) after isolation of exosomes and other EVs, please handle reagents carefully and keep them as sterile as possible. Additionally, if you analyze the mass spectrometry of proteins after isolation of exosomes and other EVs, please be careful of contamination from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

- 2/24 -

【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^{※1}. 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.

※1 To remove Large EVs such as apoptotic vesicles and microvesicles from a sample, use of a centrifugal filter unit (Millipore, Ultrafree-MC, GV 0.22 μm sterile, Product Code : UFC30GV0S) on the “supernatant” obtained from the sample by centrifugation at 10,000 × g for 30 minutes is recommended. The filtrate can be used as a test sample.

In the case of cell culture medium

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

【Optional: Concentration of cell culture supernatant by ultrafiltration and cautions】

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 can be efficiently recovered from concentrated sample.

Cautions for ultrafiltration concentration

Since extracellular vesicles may be adsorbed to the centrifugal ultrafiltration unit and the amount recovered may be reduced, add EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent (Code : 058-09261) (sold separately) to the sample for preventing loss of them. However, EV-Save™ contains polymers, its use is not recommended for proteomic analysis samples.

※2 Please examine appropriate culture conditions depending on cell lines. Since the amount of extracellular vesicles in the medium is small, please increase the culture scale as much as possible. (Example: 20 mL or more is better) In addition, 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 × g for 18 hours) or is commercially available.

In the case of Serum and Heparin Plasma

Please centrifuge serum and heparin plasma used in this section at 1,200 × g beforehand or prepare the processed sample.

When exosomes and Large EVs are needed, 1,200 × g supernatant is used as a sample for purification. In that case, a floating matter may be observed in 1,200 × g centrifuged samples. When it was observed, centrifuge again at 1,200 × g and use it as a sample for exosome and Large EVs purification.

- 1) Centrifuge a sample at 10,000 × g for 30 minutes at 4 °C to remove the large EVs^{※3}.
- 2) Transfer the supernatant from step 1) into a new tube. … (**10,000 × g supernatant**)

※3 When Large EVs are needed, use ppt of Large EVs obtained by centrifugation at 10,000 × g as sample after suspending it with 500 μL to 1 mL of TBS.

In the case of EDTA Plasma and Citrated Plasma

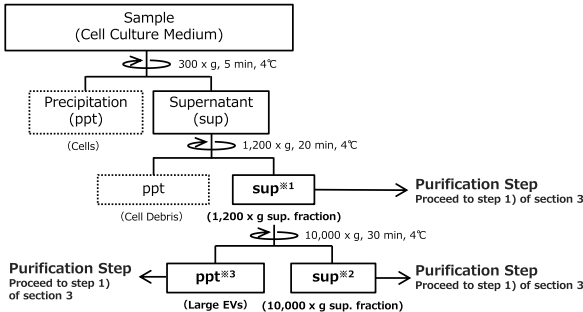
Please centrifuge EDTA plasma and citrated plasma used in this section at 1,200 × g beforehand or prepare the processed sample.

In the case of EDTA and citrated plasma, the anticoagulant contained in the sample inhibits the binding of extracellular vesicles to Exosome Capture Beads. Therefore, adjust the heparin sodium solution just before the affinity reaction, add it to the centrifuged sample, and proceed to the purification step. Details are described in the section on **EDTA Plasma and Citrated Plasma** in 3. Affinity Reaction.

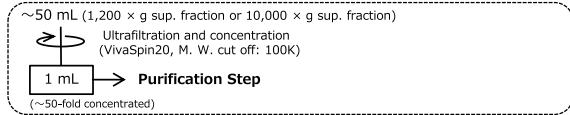
- 1) Centrifuge a sample at 10,000 × g for 30 minutes at 4 °C to remove the large EVs^{※3}.
- 2) Transfer the supernatant from step 1) into a new tube. … (**10,000 × g supernatant**)

[Flowchart of Sample Preparation (Section 1)]

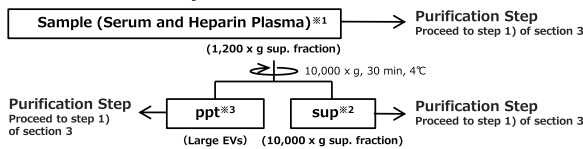
Cell Culture Medium



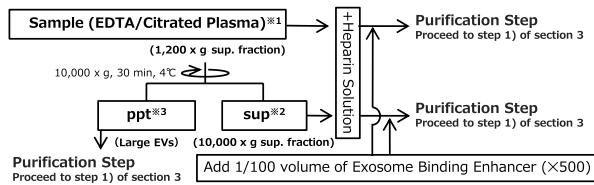
Concentration (optional)^{※4}



Serum and Heparin Plasma



EDTA Plasma and Citrated Plasma



- ※1 When **exosomes and large EVs** are needed, use 1,200 x g sup. fraction as sample.
- ※2 When **exosomes** are needed, use 10,000 x g sup. fraction as sample.
- ※3 When **Large EVs** are needed, use ppt of Large EVs obtained by centrifugation at 10,000 x g as sample after suspending it with TBS.
- ※4 The concentration step is an option when using a large volume (~ 50 mL) of cell culture supernatant as a sample for purification. However, since recovery efficiency improves, please perform it as much as possible.

2. Immobilization of Exosome Capture

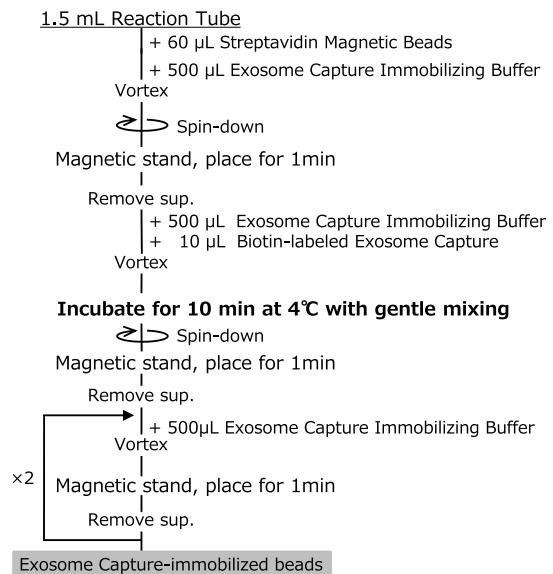
This is the section to immobilize Biotin-labeled Exosome Capture reagent to Streptavidin Magnetic Beads. Please use the 1.5 mL Reaction Tube (included) in the downstream experiment which requires magnetic beads operation^{※4}.

- 1) Transfer 60 μL ^{※5} of Streptavidin Magnetic Beads into a new 1.5 mL Reaction Tube.
- 2) Add 500 μL of Exosome Capture Immobilizing Buffer into the 1.5 mL Reaction Tube from step 1) and suspend it 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) 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 3) and mix by vortexing.
- 5) Mix for 10 minutes at 2-10 $^{\circ}\text{C}$ with rotator or tube mixer.
- 6) Spin down 5), then places it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 7) Add 500 μL of Exosome Capture Immobilizing Buffer into the 1.5 mL Reaction Tube from step 6) and mix by vortexing.
- 8) Spin down 7), then places it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 9) Repeat steps 7)-8) twice. **Exosome Capture-immobilized beads**

- ※4 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.
- ※5 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 x g supernatant** as sample. Additionally, when highly purified exosomes are needed, use **10,000 x g supernatant** as sample. Please note that the affinity reaction protocol for EDTA plasma and citrated plasma are different.

In the case of cell culture medium, serum, and heparin plasma

- 1) Transfer sample (max volume : 1 mL)^{*6} 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.
- 4) Spin down 3), then places it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant^{*7} after separation of magnetic beads and supernatant. . . . **EVs-binding beads**

In the case of EDTA/citrated plasma

- 1) Dissolve 10,000U of sodium heparin (Code : 085-00134) with purified water to make 1,000U/mL heparin sodium solution^{*8}.
 - 2) Transfer sample (max volume : 1 mL) ^{*6} to a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not included in this kit) and add 1 : 200 volume of heparin sodium solution to sample. (final conc. : 5 U/mL)
 - 3) Add 1:100 volume of Exosome Binding Enhancer (× 500) to 2) and mix by vortexing. . . . **A sample including Exosome Binding Enhancer (× 500)**
 - 4) 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.
 - 5) Mix for 3 hours ~ at 2-10 °C with rotator.
 - 6) Spin down 5), then places it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant^{*7} after separation of magnetic beads and supernatant. . . . **EVs-binding beads**
- ※6 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 μL → 500 μL)
- ※7 When further recovery of remaining extracellular vesicles is needed, please store the used supernatant.
- ※8 The maximum usage per kit (for 10 purification) is 100 μL. After preparation, please keep refrigerated.

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^{*9}.

- 1) Add 1 : 500 volume of Exosome Binding Enhancer (× 500) to the required Washing Buffer^{*10} and mix by vortexing^{*11}.
- 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.
In the case of EDTA/citrated plasma
After adding 1:200 volume of heparin sodium solution to 1 mL of Washing buffer (+ Exosome Binding Enhancer (× 500)) only at the first washing (final conc. : 5U/mL), suspend with a vortex mixer.
- 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) Add 1 mL of Washing Buffer (+ Exosome Binding Enhancer (× 500)) and mix by vortexing.
- 5) Spin down 4), then places it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 6) Repeat steps 4)-5) one more time.
- 7) Spin down again the 1.5 mL Reaction Tube from step 6), then places it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant completely after separation of magnetic beads and supernatant^{*12}. . . . **Washed EVs-binding beads**

※9 If the addition of Exosome Binding Enhancer (× 500) to Washing buffer is omitted, captured exosomes and EVs will be eluted from the magnetic beads by Washing Buffer during washing section.

※10 The required volume of Washing Buffer is 3 mL per reaction.

※11 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.

※12 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 step is to elution section of extracellular vesicles from **Washed EVs-binding beads**. By adding EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent (Code : 058-09261) (sold separately) to the Exosome Elution Buffer used in this section, the adsorption of extracellular vesicles to the tube can be suppressed and the recovery efficiency can be increased. However, EV-Save™ contains polymers, its use is not recommended for proteomic analysis samples.

- 1) Add 50 μL of Exosome Elution Buffer into the 1.5 mL Reaction Tube containing **Washed EVs-binding beads** and mix by vortexing^{*13}, then spin down.
- 2) Places it at room temperature for 10 minutes. After the reaction, resuspend by vortexing and spin down^{*13}.
- 3) Places the Reaction Tube from step 2) 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.
- 4) Add 50 μL of Exosome Elution Buffer into the 1.5 mL Reaction Tube from step 3) again, and mix by vortexing^{*13}, then spin down.
- 5) Places it at room temperature for 10 minutes. After the reaction, resuspend by vortexing and spin down^{*13}.
- 6) Places the Reaction Tube from step 5) on the magnetic stand for 1 minute. Transfer the supernatant into the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 3) after separation of magnetic beads and supernatant, and then pool together^{*14, 15}. (Total: 100 μL)

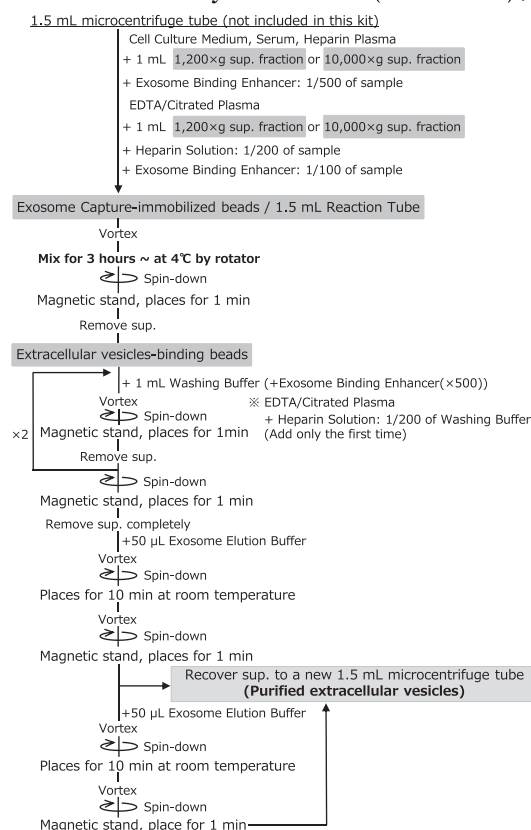
※13 If the magnetic beads aggregate and can not be uniformly suspended with only a vortex mixer, suspend the beads evenly while applying tapping or pipetting operation. Please avoid excessive suspension using a tube mixer.

※14 **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 ※7) into the 1.5 mL Reaction Tube containing **Exosome Capture-immobilized beads** from step 6) of section 5 and repeat the section 3-3) to the section 5 as necessary. When using EDTA/Citrated plasma, repeat from 3-5). This kit includes the required reagents to reuse a maximum of 4 times.

※15 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)]



[Optional]

1. RNA extraction from Purified Extracellular Vesicles

In the case of RNA purification from eluted extracellular vesicles, please add 100 μL of Exosome Elution Buffer to pooled eluate to prepare 200 μL 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.

2. Recycling of Exosome Capture-immobilized beads after eluting of extracellular vesicles

Used Exosome Capture-immobilized beads can be recycled for "Repeated extraction of extracellular vesicles from the

same sample (refer to ※14)" and "Purification of extracellular vesicles from culture supernatant sample of the same lot and body fluid sample of the same lot". Recycling is up to 4 times.

When purifying extracellular vesicles from samples of the same lot, prepare samples first and proceed from affinity reaction [section 3-1)].

When storing used Exosome Capture-immobilized beads, please add the Washing buffer in the kit or 1 × TBS containing 0.05 w/v% sodium azide to the Reaction Tube containing the used Exosome Capture immobilized beads and suspend it. After suspension, keep it at 2-10 °C.

As a record of our company, it has been confirmed that after 3 months elapsed Exosome Capture immobilized-beads can be reused. However, please use it as soon as possible.

[Related Products]

Code No.	Description	Size
297-79201	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD)	96 reactions
298-80601	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)	96 reactions
297-79701	PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit	300 reactions
290-80301	PS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit	1 Kit (0.5 mL Slurry)
016-27061	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13)	20 μL
012-27063		100 μL
018-27641	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13),	25 tests
014-27643	Fluorescein Conjugated	100 tests
013-27711	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13),	20 μL
019-27713	Biotin Conjugated	100 μL
011-27751	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13),	25 tests
017-27753	Red Fluorochrome (635) Conjugated	100 tests
018-27761	Anti CD9, Monoclonal Antibody (1K)	20 μL
014-27763		100 μL
015-27771	Anti CD81, Monoclonal Antibody (17B1)	20 μL
011-27773		100 μL
058-09261	EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent	1 mL
290-35591	Magnet Stand	1 each
295-71701	microRNA Extractor SP Kit	50 reactions
317-90175	10 × TBS (pH 7.4)	500 mL

[References]

- 1) W. Nakai, *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 33935 (2016).
- 2) A. Kraft, W81 Award. (2017).
- 3) S. Osawa, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **488**, 232-238 (2017).
- 4) S. Nagashima, *et al.*, *J. Virol.*, **91**(22), e00822-17 (2017).
- 5) T. Yoshida, *et al.*, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, **77**(1), 3.45.1-3.45.18 (2017).
- 6) S. Saito, *et al.*, *Sci. Rep.*, **8**, 3997 (2018).

- 7) H. Kobayashi, *et al.*, *Nagoya J. Med. Sci.*, **80**(2), 141-153 (2018).
- 8) Y. Obata, *et al.*, *JCI Insight*, **3**(8), e99680 (2018).
- 9) R.C. Middleton, *et al.*, *J. Extracell. Vesicles*, **7**(1), 1456888 (2018).
- 10) H. Kawahara, and R. Hanayama, *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 1119-1125 (2018).
- 11) M. Santiana, *et al.*, *Cell Host & Microbe*, **24**, 208-220 (2018).
- 12) T. Antes, *et al.*, *J. Nanobiotechnol.*, **16**, 61 (2018).
- 13) H. Kimura, *et al.*, *Clinical Cancer Research*, **25**(6), 1936-1947 (2019).
- 14) G. Gorji-Bahri, *et al.*, *Current Gene Therapy*, **18**, 336-350 (2018).
- 15) H. Xu, *et al.*, *Anal. Chem.*, **90**(22), 13451-13458 (2018).
- 16) H. Kuroda, *et al.*, *Mol Pharm.*, **16**, 292-304 (2019).
- 17) J. Juan, *et al.*, *Stem. Cell Res. Ther.*, **10**(1), 95 (2019).
- 18) L. Zhi, *et al.*, *Cell Death Discovery*, **5**, 79 (2019).
- 19) G.K. Patel *et al.*, *Sci Rep.*, **9**(1), 5335 (2019).
- 20) Y.L. Tai *et al.*, *J. Biomed. Sci.* **26**(1), 35 (2019).
- 21) Y. Sugihara *et al.*, *PLoS One.*, **14**(5), e0217394 (2019).

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

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>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

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

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : +49-2131-3111-0
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トな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
- インタクトな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 μ L × 1本
(2) Biotin-labeled Exosome Capture	20 μ L × 1本
(3) Exosome Capture Immobilizing Buffer	7 mL × 1本
(4) Exosome Binding Enhancer (× 500)	100 μ L × 1本
(5) Washing Buffer	30 mL × 1本
(6) Exosome Elution Buffer	1 mL × 1本
(7) Reaction Tubes	4本

- 13/24 -

・ 10 回用

(1) Streptavidin Magnetic Beads	600 μ L × 1本
(2) Biotin-labeled Exosome Capture	100 μ L × 1本
(3) Exosome Capture Immobilizing Buffer	35 mL × 1本
(4) Exosome Binding Enhancer (× 500)	500 μ L × 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 (ローテーター) 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ブ処理または市販の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

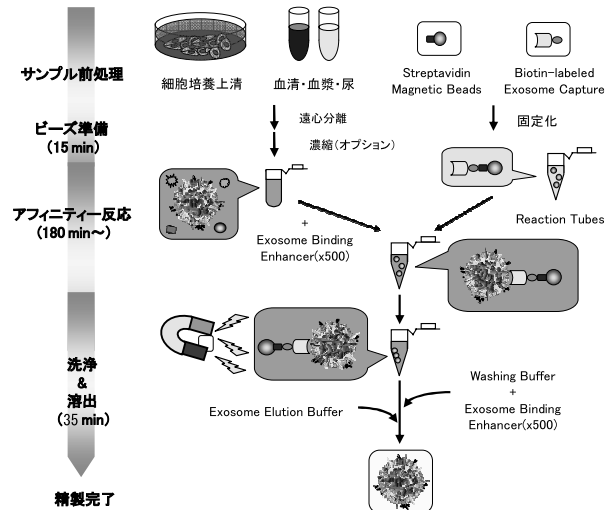
エクソソームや他の細胞外小胞を単離後に核酸 (RNA、DNA) の解析を行う場合には、試薬の取扱いには十分注意し、使用する試薬類は可能な限り無菌状態を保つよう心掛けてください。また単離後にタンパク質の質量分析を行う場合には、タンパク質の混入に十分注意してください。

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。

- 14/24 -

【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^{※1}。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。

※1 サンプルからアポトーシス小胞やマイクロベジクルなどの Large EVs を除去したい場合、10,000×g、30分間遠心分離した「上清」を取得後、遠心式フィルターユニット（Millipore社 Ultrafree-MC, GV 0.22 μm 滅菌済、メーカーコード：UFC30GV0S）を通した濾過液をサンプルとしてご使用ください。

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^{※2}。
- 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：培養上清の限外濾過濃縮と注意点】

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 以下まで限外濾過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。

限外濾過濃縮する場合の注意点

細胞外小胞が遠心式限外濾過ユニットに吸着し、回収量が減少する場合がありますため、サンプルに別売の EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent（Code: 058-09261）を添加してから、限外濾過濃縮することをお奨めします。ただし、EV-Save™ はポリマー成分を含むため、プロテオミクス解析用サンプルへの使用は推奨しません。

※2 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。培地中の細胞外小胞量は少ないため、可能な限り培養スケールを大きくしてください（例：20 mL 以上）。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・ヘパリン血漿の場合

本工程で使用する血清・ヘパリン血漿は、事前に 1,200×g の遠心分離処理を実施してください。または 1,200×g 遠心分離処理済みのサンプルをご用意ください。

エクソソーム + Large EVs を取得したい場合、1,200×g 上清を精製用サンプルとして使用しますが、1,200×g 遠心分離処理済みサンプル中に浮遊物が確認できる場合があります。その場合、再度 1,200×g の遠心分離処理を実施し、エクソソーム + Large EVs 精製用サンプルとしてご使用ください。

- 1) 10,000×g、4℃ 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^{※3}）。
- 2) 1)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 Large EVs を取得したい場合、10,000×g で遠心分離して得られる「沈殿」を 500 μL ~ 1 mL の TBS に懸濁し、サンプルとして使用してください。

EDTA 血漿・クエン酸血漿の場合

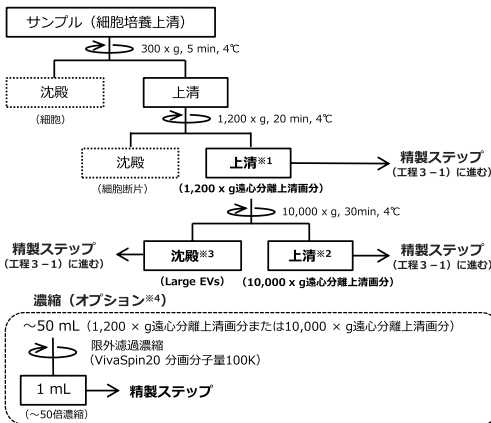
本工程で使用する EDTA 血漿およびクエン酸血漿は、事前に 1,200×g の遠心分離処理を実施してください。または 1,200×g 遠心分離処理済みのサンプルをご用意ください。

EDTA 血漿およびクエン酸血漿の場合、サンプルに含まれる抗凝剤が細胞外小胞と Exosome Capture Beads の結合を阻害します。そのため、ヘパリンナトリウム溶液をアフィニティー反応直前に調製して遠心分離処理済みサンプルへ添加し、精製ステップへお進みください。詳細は、3. アフィニティー反応の **EDTA 血漿・クエン酸血漿** の項に記載しております。

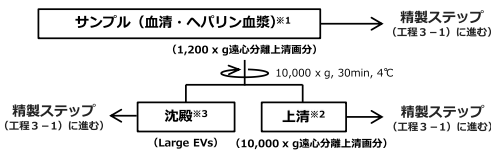
- 1) 10,000×g、4℃ で 30分間遠心分離する（大きいサイズの細胞外小胞の分離^{※3}）。
- 2) 1)の上清を新しいチューブに移す。…（**10,000×g 遠心分離上清画分**）

〔サンプルの準備フロー（工程1）〕

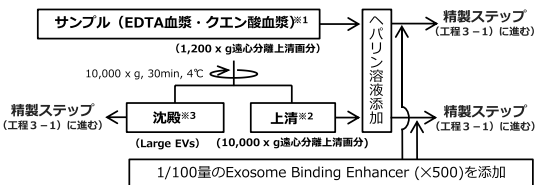
細胞培養上清の場合



血清・ヘパリン血漿の場合



EDTA血漿・クエン酸血漿の場合



- *1 **エクソソーム+Large EVsを取得したい場合**、1,200xg上清を精製用サンプルとして使用してください。
- *2 **エクソソームを取得したい場合**、10,000xg上清を精製用サンプルとして使用してください。
- *3 **Large EVsを取得したい場合**、10,000xgで遠心分離して得られる「沈殿」をTBSに懸濁してサンプルとして使用してください。
- *4 濃縮ステップは大容量（～50 mL）の細胞培養上清を精製用サンプルとして使用する場合のオプションですが、回収率が向上するため、可能な限り実施してください。

2. Exosome Captureの固定化

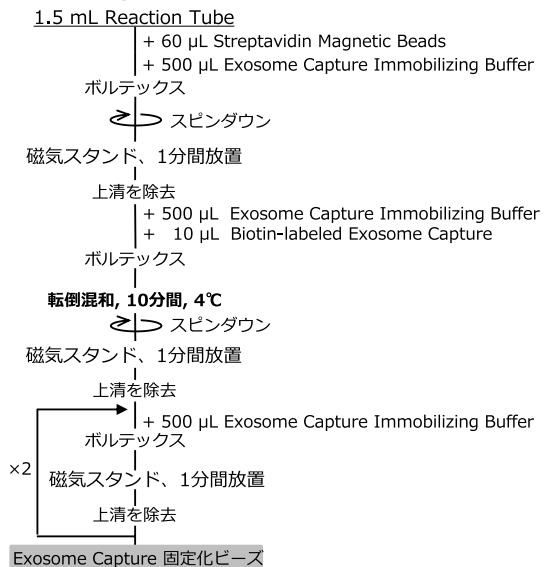
本工程はBiotin-labeled Exosome CaptureをStreptavidin Magnetic Beadsに固定化する工程です。本工程以降の磁気ビーズ使用操作では必ずキット添付の1.5 mL Reaction Tubeをご使用下さい^{※4}。

- 1) Streptavidin Magnetic Beads 60 μ L^{※5}を1.5 mL Reaction Tubeに移す。
- 2) Exosome Capture Immobilizing Buffer 500 μ Lを、1)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。
- 3) 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。

- 4) Exosome Capture Immobilizing Buffer 500 μ LとBiotin-labeled Exosome Capture 10 μ Lを、3)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。
- 5) 冷蔵（2～10℃）でローター等により転倒混和しながら10分間反応させる。
- 6) 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。
- 7) Exosome Capture Immobilizing Buffer 500 μ Lを、6)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。
- 8) 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。
- 9) 7)～8)の操作をさらに2回繰り返す。… **Exosome Capture固定化ビーズ**

- ※4 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。
- ※5 Streptavidin Magnetic Beadsは使用前にボルテックスミキサーでよく攪拌し、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）を基本プロトコールとしています。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。また、EDTA血漿・クエン酸血漿の反応プロトコールは異なるため、ご注意ください。

細胞培養上清・血清・ヘパリン血漿の場合

- 1) サンプル（最大容量 1 mL）^{※6} をキット添付品ではない 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^{※7}。… **細胞外小胞結合ビーズ**

EDTA 血漿・クエン酸血漿の場合

- 1) ヘパリンナトリウム（Code：085-00134）10,000 U を精製水で溶解し、1,000 U/mL ヘパリンナトリウム溶液を作製する^{※8}。
- 2) サンプル（最大容量 1 mL）^{※6} をキット添付品ではない 1.5 mL 容マイクロチューブに移し、サンプルに対して 1/200 容量のヘパリンナトリウム溶液を添加する。（終濃度 5 U/mL）
- 3) 2) に 1/100 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**
- 4) **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。
- 5) 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。
- 6) 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^{※7}。… **細胞外小胞結合ビーズ**

- ※6 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）。
- ※7 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。
- ※8 1 キット（10 回用）当たりの最大使用量は、100 μ L です。調整後は、冷蔵で保管してください。

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^{※9}。

- 1) 必要量^{※10} 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^{※11}。
- 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。

EDTA 血漿・クエン酸血漿の場合

- 1/200 容量のヘパリンナトリウム溶液を初回洗浄時のみ 1 mL の Washing Buffer（+ Exosome Binding Enhancer（×500））に添加後（終濃度 5 U/mL）、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) 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。
 - 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、上清をピペットで除く。
 - 6) 4)~5) の操作をさらに 1 回繰り返す。
 - 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、上清残液をマイクロピペットで完全に取り除く^{※12}。… **洗浄済み細胞外小胞結合ビーズ**

- ※9 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。
- ※10 Washing Buffer の必要量の目安は 1 反応あたり 3 mL です。
- ※11 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、必ず使用前に調整してください。
- ※12 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取り除いてください。

5. 細胞外小胞の溶出

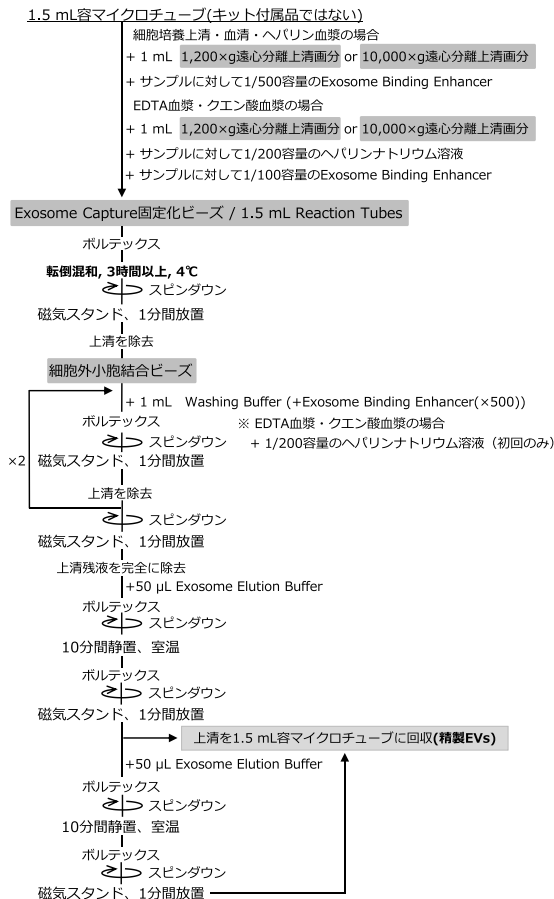
本工程は、**洗浄済み細胞外小胞結合ビーズ** から細胞外小胞を溶出する工程です。本工程で使用する Exosome Elution Buffer に別売の EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent（Code：058-09261）を添加することで、回収チューブへの細胞外小胞の吸着を抑え、回収効率を高めることができます。ただし、EV-Save™ はポリマー成分を含むため、プロテオミクス解析用サンプルへの使用は推奨しません。

- 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し、卓上遠心機でスピンドアウンする^{※13}。
- 2) 10 分間室温で静置する。反応後、ボルテックスミキサーで再懸濁し、卓上遠心機でスピンドアウンする^{※13}。
- 3) 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後、上清をキット添付品ではない新しい 1.5 mL 容マイクロチューブに回収する。
- 4) 3) 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し、卓上遠心機でスピンドアウンする^{※13}。
- 5) 10 分間室温で静置する。反応後、ボルテックスミキサーで再懸濁し、卓上遠心機でスピンドアウンする^{※13}。

6) 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3)の1.5 mLマイクロチューブに回収しプールする※14,15。

- ※13 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ティング操作を加えながら、ビーズを均一に懸濁して下さい。また、チューブミキサーを用いた過度な懸濁は避けてください。
- ※14 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5-6)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(※7参照)を添加し、必要に応じて工程3-3)～工程5-6)を繰り返して下さい。EDTA血漿・クエン酸血漿の場合、工程3-5)～工程5-6)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。
- ※15 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)〕



〔オプション〕

1. 精製細胞外小胞からのRNA抽出

取得した細胞外小胞からRNAを精製したい場合は、上記3)と6)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。

2. 細胞外小胞溶出後のExosome Capture固定化ビーズの再利用

「同一サンプルから細胞外小胞を繰り返し抽出する場合(※14参照)」や「同一ロットの培養上清サンプル、体液サンプルから細胞外小胞を精製する場合」に使用済みExosome Capture固定化ビーズを再利用(最大4回)できます。

同一ロットのサンプルから細胞外小胞を精製する場合、サンプルの準備を行い、アフィニティー反応【工程3-1)】から進めてください。

使用済みExosome Capture固定化ビーズを保存する場合、キット添付のWashing bufferまたは自家調製した0.05 w/v% sodium azideを含む1×TBSをReaction Tubeに添加して使用済みExosome Capture固定化ビーズを懸濁し、冷蔵保存してください。当社実績で、3ヵ月経過後も使用済みExosome Capture固定化ビーズが再利用できることが確認できていますが、可能な限り早くご使用ください。

【関連製品】

コード No.	品名	容量
297-79201	PS Capture™ エクソソームELISAキット (抗マウスIgG POD)	96 回用
298-80601	PS Capture™ エクソソームELISAキット (ストレプトアビジンHRP)	96 回用
297-79701	PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット	300 回用
290-80301	PS Capture™ エクソソームアイソレーションレジソキット	1 Kit (0.5 mL Slurry)
016-27061		20 μL
012-27063	抗CD63, モノクローナル抗体 (3-13)	100 μL
018-27641	抗CD63, モノクローナル抗体 (3-13),	25 回用
014-27643	フルオレセイン結合	100 回用
013-27711	抗CD63, モノクローナル抗体 (3-13),	20 μL
019-27713	ビオチン結合	100 μL
011-27751	抗CD63, モノクローナル抗体 (3-13),	25 回用
017-27753	赤色蛍光色素 (635) 結合	100 回用
018-27761		20 μL
014-27763	抗CD9, モノクローナル抗体 ((1K)	100 μL
015-27771		20 μL
011-27773	抗CD81, モノクローナル ((17B1)	100 μL
058-09261	EV-Save™ 細胞外小胞プロッキング試薬	1 mL
290-35591	マグネットスタンド	1 each
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】

- 1) W. Nakai, *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 33935 (2016).
- 2) A. Kraft, W81 Award. (2017).
- 3) S. Osawa, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **488**, 232-238 (2017).
- 4) S. Nagashima, *et al.*, *J. Virol.*, **91**(22), e00822-17 (2017).
- 5) T. Yoshida, *et al.*, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, **77**(1), 3.45.1-3.45.18 (2017).
- 6) S. Saito, *et al.*, *Sci. Rep.*, **8**, 3997 (2018).
- 7) H. Kobayashi, *et al.*, *Nagoya J. Med. Sci.*, **80**(2), 141-153 (2018).
- 8) Y. Obata, *et al.*, *JCI Insight*, **3**(8), e99680 (2018).
- 9) R.C. Middleton, *et al.*, *J. Extracell. Vesicles*, **7**(1), 1456888 (2018).
- 10) H. Kawahara, and R. Hanayama, *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 1119-1125 (2018).
- 11) M. Santiana, *et al.*, *Cell Host & Microbe*, **24**, 208-220 (2018).
- 12) T. Antes, *et al.*, *J. Nanobiotechnol.*, **16**, 61 (2018).
- 13) H. Kimura, *et al.*, *Clinical Cancer Research*, **25**(6), 1936-1947 (2019).
- 14) G. Gorji-Bahri, *et al.*, *Current Gene Therapy*, **18**, 336-350 (2018).
- 15) H. Xu, *et al.*, *Anal. Chem.*, **90**(22), 13451-13458 (2018).
- 16) H. Kuroda, *et al.*, *Mol Pharm.*, **16**, 292-304 (2019).
- 17) J. Juan, *et al.*, *Stem. Cell Res. Ther.*, **10**(1), 95 (2019).
- 18) L. Zhi, *et al.*, *Cell Death Discovery*, **5**, 79 (2019).
- 19) G.K. Patel *et al.*, *Sci Rep.*, **9**(1), 5335 (2019).
- 20) Y.L. Tai *et al.*, *J. Biomed. Sci.* **26**(1), 35 (2019).
- 21) Y. Sugihara *et al.*, *PLoS One.*, **14**(5), e0217394 (2019).

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社
大阪府中央区道修町三丁目1番2号
Tel : 06-6203-3741