

Code No. 297-79701 (300 reaction)

For Genetic Research PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit

[Introduction]

Extracellular vesicles (EVs) such as exosome have attracted attention as a messenger of cell-to-cell communication and a biomarker of diseases since they include proteins, mRNAs, microRNAs, and DNAs etc. on their surface or inside and they are stably present in body fluids such as blood, urine, saliva, spinal fluid, and breast milk after being secreted from cells.

PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit includes reagents for flow cytometer available for a qualitative analysis of extracellular vesicles in a cell culture supernatant and a body fluid. It can detect any surface marker proteins on extracellular vesicles with high sensitivity by using a fluorescence-labeled anti exosome surface antigen antibody after extracellular vesicles are captured by magnetic beads on which proteins that specifically bind with phosphatidylserine (PS) on the surface of extracellular vesicles are immobilized.

[Features]

- Easy operation by magnetic beads.
- The kit can detect EVs in a sample directly without concentration procedure.
- The kit can detect any surface marker proteins of EVs within 3 hours.

[Kit contents]

This kit includes 3 components.

Components	Amount	State	Note
Exosome Capture Beads	3 mL × 1 vial	Ready for use	Store at -20°C
Washing Buffer (10 ×)	45 mL × 2 bottles	Concentrated Use after pretreatment	Store at 2-10°C after melting
Exosome Binding Enhancer (100 ×)	15 mL × 1 bottle	Concentrated Use after pretreatment	Store at 2-10°C after melting

[Storage and the expiration date of the kit]

Store the Exosome Capture Beads at -20°C. Store the Washing Buffer (10×) and the Exosome Binding Enhancer (100×) at 2-10°C after melting. The kit is stable until the expiration date under the condition (The expiration date is printed on the label).

[Additional required materials]

Reagents :

- 1) TBS (As necessary)
- 2) Fluorescence-labeled anti exosome surface antigen antibody and Fluorescence-labeled isotype control antibody
- 3) Sodium Heparin (As necessary)

Equipment :

- 1) Microcentrifuge
- 2) Vortex mixer
- 3) Tabletop centrifuge

— 1/20 —

- 4) Magnetic stand (Code : 290-35591)
- 5) Tube mixer (Code : 623-05671) (As necessary)
- 6) Micro pipette
- 7) Pipette tip
- 8) Microcentrifuge tube (1.5 mL)※1
- 9) Centrifuge tube (15 mL)
- 10) Ultrafiltration unit (Vivaspin20, M. W. cut off : 100K, Code No. VS2041) (As necessary)

※1 It was shown that several types of microcentrifuge tubes are not suitable for the reaction of exosome isolation and exosome staining. It has been confirmed that 1.5 mL microcentrifuge tubes in the following table 1 is suitable for our kit.

Manufacturer	Code No.
BM EQUIPMENT Co., LTD	BM-15
Sumitomo Bakelite Co., Ltd.	631-27511
Eppendorf	0030108116
Eppendorf	0030120086
Thermo Fisher Scientific	90410

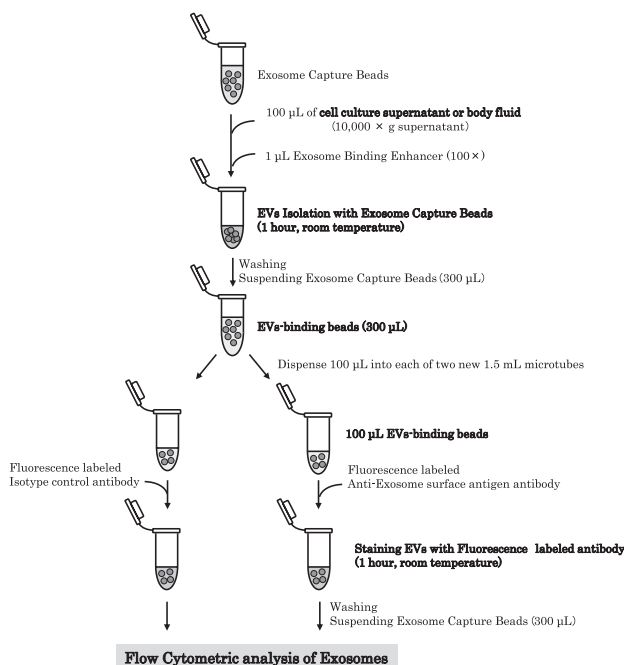
Table 1 Recommended 1.5 mL microcentrifuge tube

[Precaution for use]

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.

[Outline of procedure]



— 2/20 —

[Procedure]

1. Preparation of sample

This is the section to prepare samples. This protocol is set for cell culture supernatant and body fluids (serum and plasma). When other body fluids are used, please examine the appropriate pretreatment protocol by referring to the protocol for serum and heparin plasma.

In the case of cell culture medium

1) Culture cells under an appropriate condition ^{※2}.

※2 Please refer to appropriate culture conditions, depending on cell lines. To ensure that isolated extracellular vesicles originate from your cells, please use extracellular vesicle-depleted FBS. Extracellular vesicle-depleted FBS is prepared by ultracentrifugation (Example : at 110,000 × g for 18 hours) or is commercially available.

- 2) Harvest the cell culture medium.
- 3) Centrifuge the cell culture medium at 300 × g for 5 minutes at 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.
- 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 ^{※3}. ··· **(10,000 × g supernatant)**

※3 10,000 × g supernatant can be filtered through a 0.2 μm filter to remove the large EVs completely.

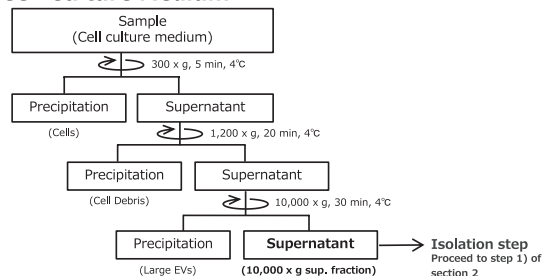
In the case of Serum, Heparin plasma, EDTA plasma and Citrated plasma ^{※4}

- 1) Centrifuge the sample at 1,200 × g for 20 minutes at 4°C to remove the cell debris.
- 2) Transfer the supernatant from step 1) into a new tube.
- 3) Centrifuge 2) at 10,000 × g for 30 minutes at 4°C to remove the large EVs.
- 4) Transfer the supernatant from step 3) into a new tube. ··· **(10,000 × g supernatant)**

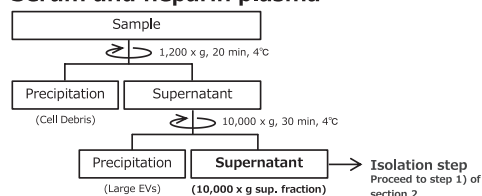
※4 In the case of EDTA plasma and Citrated plasma, the anticoagulant contained in the sample inhibits the binding of extracellular vesicles to Exosome Capture Beads. Therefore, when the sample is EDTA plasma and Citrated plasma, perform the operation for In the case of EDTA plasma and Citrated plasma according to step 8) of 2. Isolation of Extracellular Vesicles. Then proceed to 3. Immunostaining of Extracellular Vesicles.

[Flowchart of Sample Preparation (Section 1)]

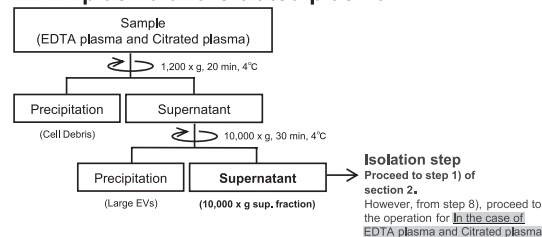
Cell Culture Medium



Serum and heparin plasma



EDTA plasma and Citrated plasma



2. Isolation of Extracellular Vesicles

This is the section to isolate extracellular vesicles from samples with Exosome Capture Beads. Here, the reaction scale for 2 reactions using a 1.5 mL microcentrifuge tube is set as the basic protocol. Scale-up is required, please increase the amount of Exosome Capture Beads, the sample volume, the amount of Exosome Binding Enhancer (100×), and the volume of **WB (+Enhancer)** per one washing in accordance with the following table 2.

Please note that the operation after step 8) is different for EDTA plasma and Citrated plasma. Choose the protocol that suit your sample type.

Qty of Reaction	Exosome Capture Beads (μL)	Sample (μL)	Exosome Binding Enhancer (100 ×) (μL)	WB (+Enhancer) used for each washing and suspending process (μL)
2 reactions (basic)	30	100	1.00	300
3 reactions	40	133	1.33	400
4 reactions	50	167	1.67	500
5 reactions	60	200	2.00	600
6 reactions	70	233	2.33	700
7 reactions	80	267	2.67	800
8 reactions	90	300	3.00	900
9 reactions	100	333	3.33	1000
10 reactions	110	367	3.67	1100

Table 2. Recommended reaction scale

- 1) Add 0.5 mL of Washing Buffer (10 ×) and 4.5 mL of ultrapure water to a 15 mL centrifuge tube and mix by vortex mixer. Moreover, add 50 μL (1:100 volume) of Exosome Binding Enhancer (100 ×) to the 15 mL centrifuge tube containing Washing Buffer (10 ×) and ultrapure water, and mix it by vortex mixer. ... **WB (+Enhancer)**
- 2) Add 300 μL of **WB (+Enhancer)** to a new 1.5 mL microcentrifuge tube.
- 3) Suspend Exosome Capture Beads thoroughly for 10 sec ~ using a vortex mixer. Make sure homogeneous suspension of the magnetic beads is achieved before use.
- 4) Transfer 30 μL of Exosome Capture Beads from step 3) to the 1.5 mL microcentrifuge tube of step 2).
- 5) Vortex the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 5) for 5 sec ~ and spin down, and then place it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 6) Add 300 μL of **WB (+Enhancer)** to the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 6) and vortex it for 5 seconds ~.
- 7) Spin down the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 7), and then place it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 8) Add 100 μL of **10,000 × g supernatant** to the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 7) and vortex it for 5 seconds ~.
- 9) Add 1 μL of Exosome Binding Enhancer (100 ×) to the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 8) and vortex it for 5 seconds ~.
- 10) Place the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 9) at room temperature for an hour with vortexing the tubes every 20 minutes^{*5}.

※5 When a tube mixer is used in the step 10), the mixing speed of the tube mixer should be set at 500 rpm. Faster speed than 500 rpm may result in the inefficient binding between EVs and the Exosome Capture Beads.
Recommended tube mixer : MS3 Control, IKA, Code : 623-05671

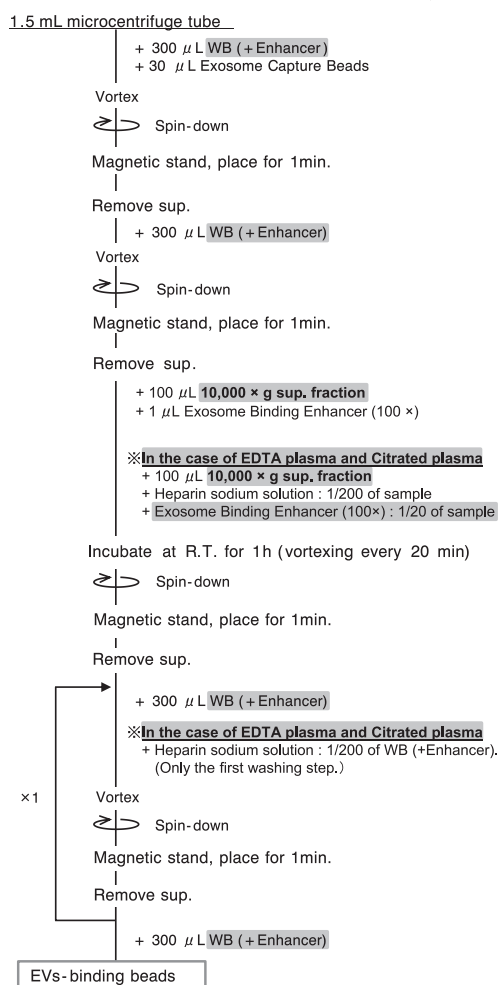
- 11) Spin down the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 10), and then place it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 12) Add 300 μL of **WB (+Enhancer)** and vortex it for 3 seconds ~.
- 13) Spin down the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 12), and then place it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 14) Repeat steps 12)-13) again.
- 15) Add 300 μL of **WB (+Enhancer)** and vortex it for 3 seconds ~.
... **EVs-binding beads**

In the case of EDTA plasma and Citrated plasma

- 8) Dissolve 10,000 U of sodium heparin (Code: 085-00134) with purified water to make 1,000 U/mL heparin sodium solution.
- 9) Add 100 μL of **10,000 × g supernatant** to the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 7) and vortex it for 5 seconds ~.
- 10) Add 1 : 200 volume of heparin sodium solution to 1.5 mL microcentrifuge tube from step 9)'. (final concentration : 5 U/mL)
- 11) Add 1 : 20 volume of Exosome Binding Enhancer (100 ×) to 1.5 mL microcentrifuge tube from step 10)' and vortex it for 5 seconds ~.
- 12) Spin down 1.5 mL microcentrifuge tube from step 11)' and then place it at room temperature for an hour with vortexing the tube every 20 minutes^{*5} for 5 seconds ~.
- 13) Spin down 1.5 mL microcentrifuge tube from step 12)', and then place it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 14) Add 300 μL of **WB (+Enhancer)** to which 1 : 200 volume of heparin sodium solution was added, and vortex it for 3 seconds ~.
- 15) Spin down 1.5 mL microcentrifuge tube from step 14)', and then

- place it on the magnetic stand for 1 minutes. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 16) Add 300 μL of **WB (+Enhancer)** and vortex it for 3 seconds ~.
 - 17) Spin down 1.5 mL microcentrifuge tube from step 16)', and then place it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
 - 18) Add 300 μL of **WB (+Enhancer)** and vortex it for 3 seconds ~. ... **EVs-binding beads**

[Flowchart of Extracellular Vesicles Isolation (Section 2)]



3. Immunostaining of Extracellular Vesicles

This is the section to immunostain extracellular vesicles with fluorescence-labeled antibody (fluorescence-labeled anti exosome surface antigen antibody and fluorescence-labeled isotype control antibody). Here, the reaction scale for 2 reactions using a 1.5 mL microcentrifuge tube is set as the basic protocol. When the reaction scale at **2. Isolation of Extracellular Vesicles** was scaled up than 2 reactions, increase the number of aliquots of **EVs-binding beads** dispensed in step 1) in this section.

- 1) Dispense 100 μL of **EVs-binding beads** into each of two new 1.5 mL microcentrifuge tubes ^{※6}.

※6 When the reaction scale at **2. Isolation of Extracellular Vesicles** was scaled up than 2 reactions, increase the number of aliquots of **EVs-binding beads** according to the reaction scale. (Example : when the section 2 was performed in 6 reactions, dispense 100 μL of **EVs-binding beads** suspension into each of six new 1.5 mL microcentrifuge tubes.)

- 2) Add fluorescence-labeled anti exosome surface antigen antibodies or fluorescence-labeled isotype control antibodies into the each of 1.5 mL microcentrifuge tubes from step 1) and vortex it for 5 seconds ^{※7}.

※7 Optimization of antibody concentration is necessary to obtain good sensitivity. In the first experiment, add the recommended amount used per test in accordance with the manufacturer's instruction (e.g. the amount of antibody used per 1×10^6 cells).

- 3) Place the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 2) at room temperature for an hour with vortexing the tubes every 20 minutes ^{※8}.

※8 When a tube mixer is used in the step 3) , the mixing speed of the tube mixer should be set at 500 rpm. Faster speed than 500 rpm may result in the inefficient binding between EVs and the Exosome Capture Beads.
Recommended tube mixer : MS3 Control, IKA, Code : 623-05671

- 4) Spin down the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 3), and then place it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 5) Add 300 μL of **WB (+Enhancer)** and vortex it for 3 seconds~.
- 6) Spin down the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 5), and then place it on the magnetic stand for 1 minute. Remove the supernatant after separation of magnetic beads and supernatant.
- 7) Repeat steps 5)-6) again.
- 8) Add 300 μL of **WB (+Enhancer)** and vortex it for 3 seconds~ ^{※9}.

※9 The suspension volume of Exosome Capture Beads can be changed in the step 8) according to the flow cytometer used. Please adjust the appropriate amount of **WB (+Enhancer)**.

- 9) Analyze the Exosome Capture Beads by flow cytometry ^{※10, 11}.

※10 When analyzing the Exosome Capture Beads by flow cytometry, as shown in Fig. 1 below, gate the fraction in which Exosome Capture Beads are not aggregated from the plot diagram composed of forward scattered light (FS) and side scattered light (SS), and then compare the fluorescence intensity of the Exosome Capture Beads contained inside the gate.

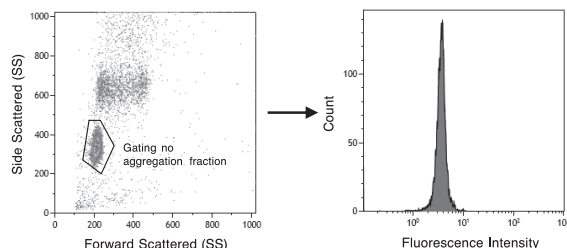
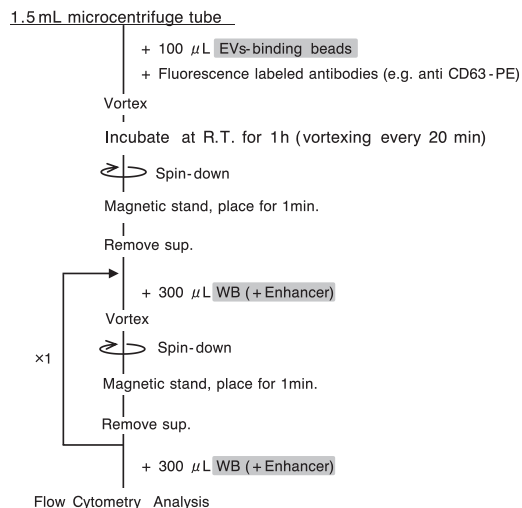


Fig. 1 Procedure for analysis of extracellular vesicles using flow cytometry

※11 Filtrating the Exosome Capture Beads with cell strainer before the flow cytometric analysis may decrease the aggregation of Exosome Capture Beads. (Falcon[®] 5 mL Round Bottom Polystyrene Test Tube, with Cell Strainer Snap Cap, Code : 643-50461 etc.)

(Flowchart of Extracellular Vesicles Immunostaining (Section 3))



[Related products]

Code No.	Product Name	Package 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
299-77603	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS	2 purifications
293-77601		10 purifications
290-80301	PS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit	1 Kit (0.5 mL Slurry)
012-27063	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13)	100 μL
018-27641	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Fluorescein Conjugated	25 tests
014-27643		100 tests
011-27751	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Red Fluorochrome (635) Conjugated	25 tests
017-27753		100 tests
019-27713	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Biotin Conjugated	100 μL
014-27763	Anti CD9, Monoclonal Antibody (1K)	100 μL
013-27951	Anti CD9, Rat Monoclonal Antibody (30B), Biotin Conjugated	20 μL
019-27953		100 μL
011-27773	Anti CD81, Monoclonal Antibody (17B1)	100 μL
052-09301	Exosomes, from COLO201 cells, purified	50 μL
058-09261	EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent	1 mL
085-00134	Heparin Sodium	10,000 U
317-90175	10 × TBS (pH 7.4)	500 mL
290-35591	Magnet Stand	1 unit
623-05671	MS 3 Control (tube mixer)	1 unit

[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.J. 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. Jin, *et al.*, *Stem Cell Res. Ther.*, **10** (1), 95 (2019).
- 18) Z. Liu, *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).
- 22) W. Ando, *et al.*, *Sci. Rep.*, **9** (1), 13595 (2019).
- 23) S. Muraoka, *et al.*, *Front. Neurosci.*, **13**, 1059 (2019).
- 24) K. Yuyama, *et al.*, *Sci. Rep.*, **9**, 16827 (2019).
- 25) L. Sun, *et al.*, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2019**, 4506303 (2019).
- 26) G. Lou, *et al.*, *J. Exp. & Clin. Cancer Res.*, **39**, 4 (2020).
- 27) C-Y. Liu, *et al.*, *CNS Neurosci. Ther.*, **26** (2), 189-196 (2020).
- 28) S. Muraoka, *et al.*, *Methods*, *in press* (2020).
- 29) J. Jin, *et al.*, *Biomed. Res. Int.*, **2020**, Article ID 2685305 (2020).

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. 297-79701 (300回用)

遺伝子研究用 PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit

【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、DNA 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。

本キットは、細胞培養上清や体液検体に含まれる細胞外小胞をフローサイトメトリーにより定性解析することができる試薬です。細胞外小胞表面のホスファチジルセリン (PS) と特異的に結合するタンパク質が固相化された磁気ビーズを用います。この磁気ビーズに細胞外小胞を反応させて固定化した後、任意の細胞外小胞マーカータンパク質に対する蛍光標識抗体を用いることで、目的のマーカータンパク質を高感度に検出できます。

【特長】

- 磁気ビーズにより簡便に操作できます。
- 濃縮操作を行わずに、サンプルに含まれる細胞外小胞を直接検出することができます。
- 任意のマーカータンパク質を表面に有する細胞外小胞を短時間 (3時間以内) で検出することができます。

【キット内容】

本キットは3つの構成部材からなります。

構成試薬名	容量	状態	備考
Exosome Capture Beads	3mL × 1本	そのまま使用	—
Washing Buffer (10 ×)	45mL × 2本	調製後使用	融解後 2 ~ 10℃ 保存
Exosome Binding Enhancer (100 ×)	15mL × 1本	調製後使用	融解後 2 ~ 10℃ 保存

【キットの保存と使用期限】

Exosome Capture Beads は、-20℃で保存してください。Washing Buffer (10 ×) および Exosome Binding Enhancer (100 ×) は、融解後、2 ~ 10℃で保存してください。この保存条件下でキットは使用期限まで安定です (使用期限はラベルに記載)。

【キット以外に準備する物】

試薬:

- 1) TBS (必要に応じて)
- 2) 蛍光標識エクソソーム表面抗原抗体、蛍光標識アイソタイプコントロール抗体
- 3) ヘパリンナトリウム (必要に応じて)

器具:

- 1) 冷却式遠心分離機
- 2) ボルテックスミキサー
- 3) 卓上遠心機
- 4) 磁気スタンド (Code : 290-35591)
- 5) チューブミキサー (Code : 623-05671) (必要に応じて)
- 6) マイクロピペット
- 7) ピペットチップ
- 8) 1.5mL 容マイクロチューブ*1
- 9) 15mL 容遠沈管

— 11/20 —

- 10) 遠心式限外濃縮ユニット (Vivaspin20 分画分子量 100K, Code : VS2041) (必要に応じて)

※ 1.5mL 容マイクロチューブの種類により、適切なシグナルが得られない可能性があります。以下の表1に示す1.5mL 容マイクロチューブについては、適切なシグナルが得られることを確認しています。

メーカー名	製品コード
ビーエム機器株式会社	BM-15
住友ベークライト株式会社	631-27511
Eppendorf	0030108116
Eppendorf	0030120086
Thermo Fisher Scientific	90410

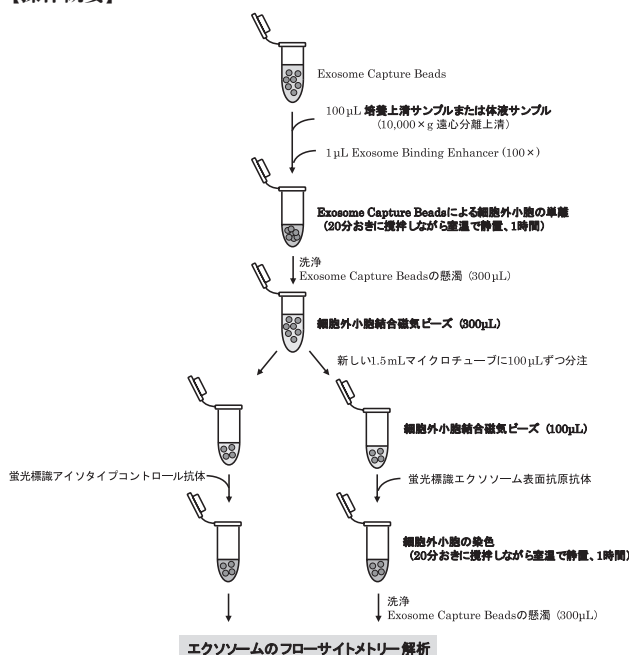
表1 本キットの推奨 1.5mL 容マイクロチューブ

【操作前の注意点】

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など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。

【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工程です。本サンプル準備プロトコルでは細胞培養上清および体液サンプル (血清、血漿) を用いる場合のプロトコルを記載しています。その他の体液サンプルを用いる場合は血清・ヘパリン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。

— 12/20 —

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 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、超遠心分離処理 (例、100,000 × 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。

- 2) 細胞培養液を回収する。
- 3) 細胞培養液を 300 × g、4℃ 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) 1,200 × g、4℃ 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。
- 7) 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)。
- 8) 7)の上清を新しいチューブに移す^{※3}。…(10,000 × g 遠心分離上清画分)

※3 大きいサイズの細胞外小胞を完全に除去したい場合は、10,000 × g の遠心上清を 0.2 μm フィルターでろ過処理してください。

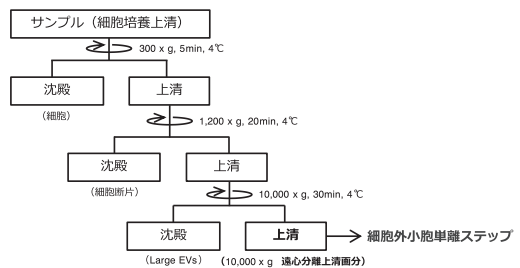
血清・ヘパリン血漿及び EDTA 血漿・クエン酸血漿の場合^{※4}

- 1) サンプルを 1,200 × g、4℃ 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。
- 3) 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)。
- 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)

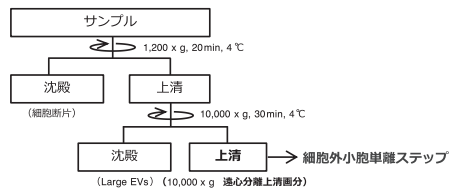
※4 EDTA 血漿・クエン酸血漿サンプルでは、サンプルに含まれる抗凝固剤が細胞外小胞と Exosome Capture Beads の結合を阻害します。そのため、サンプルが EDTA 血漿・クエン酸血漿の場合は 2. 細胞外小胞の単離の 8) より、EDTA 血漿・クエン酸血漿サンプルの場合の操作を行い、3. 細胞外小胞の染色の工程へお進みください。

〔サンプルの準備フロー (工程 1)〕

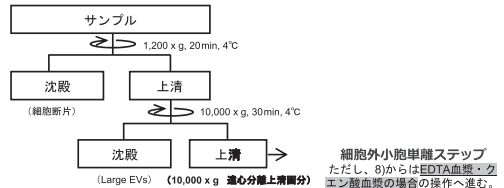
細胞培養上清の場合



血清・ヘパリン血漿の場合



EDTA血漿・クエン酸血漿の場合



2. 細胞外小胞の単離

本工程は Exosome Capture Beads とサンプルを反応させ、サンプル中の細胞外小胞を単離する工程です。1.5mL 容マイクロチューブを用いた反応系 (2 反応分) を基本プロトコールに設定しています。反応スケールを大きくする場合、Exosome Capture Beads 使用量、サンプル量、サンプルに添加する Exosome Binding Enhancer (100 ×) 液量、一回の洗浄で使用する **WB (+Enhancer)** 液量を以下の表に従いスケールアップさせてください。

EDTA 血漿・クエン酸血漿の場合、8) から操作が変わります。サンプルの種類に合わせたプロトコールにお進みください。

反応数	Exosome Capture Beads (μL)	サンプル (μL)	サンプルに添加する Exosome Binding Enhancer (100 ×) 液量 (μL)	1 回の洗浄及び磁気ビーズの懸濁に使用する WB(+Enhancer) 液量 (μL)
2 反応分 (基本)	30	100	1.00	300
3 反応分	40	133	1.33	400
4 反応分	50	167	1.67	500
5 反応分	60	200	2.00	600
6 反応分	70	233	2.33	700
7 反応分	80	267	2.67	800
8 反応分	90	300	3.00	900
9 反応分	100	333	3.33	1000
10 反応分	110	367	3.67	1100

表 2 各反応数における試薬およびサンプルの使用量

- 1) 15mL 容遠沈管に 0.5mL の Washing Buffer (10 ×) と 4.5mL の超純水を加えてボルテックスで混合する。さらに 50 μL (1/100 容量) の Exosome Binding Enhancer (100 ×) を添加し、ボルテックスミキサーで混合する。…**WB (+Enhancer)**

- 2) 新しい1.5mL容マイクロチューブに、**WB (+Enhancer)** を300 μ L 加える。
- 3) Exosome Capture Beadsが入ったガラスバイアルをボルテックスで10秒以上攪拌し、磁気ビーズを十分に懸濁する。
- 4) 3)のガラスバイアルから30 μ LのExosome Capture Beadsを取り、2)の**WB (+Enhancer)** を含む1.5mL容マイクロチューブに加える。
- 5) 4)の1.5mL容マイクロチューブを5秒程度ボルテックスし、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。その後、上清をピペットで除く。
- 6) 5)の1.5mL容マイクロチューブに**WB(+Enhancer)** を300 μ L加えて、5秒程度ボルテックスする。
- 7) 6)の1.5mL容マイクロチューブ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。その後、上清をピペットで除く。
- 8) 7)の1.5mL容マイクロチューブに100 μ Lの**10,000 \times g 遠心分離上清画分**を加え、5秒程度ボルテックスする。
- 9) 8)の1.5mL容マイクロチューブに1 μ LのExosome Binding Enhancer (100 \times)を添加して、5秒程度ボルテックスする。
- 10) 9)の1.5mL容マイクロチューブを室温で1時間静置する。その間、サンプル添加後20分、40分、1時間のタイミングで9)の1.5mL容マイクロチューブを5秒程度ボルテックスして、磁気ビーズを攪拌する^{*5}。

※5 チューブミキサーを使用する場合は、500rpm程度の回転速度で室温、1時間攪拌してください。回転速度が速い場合、Exosome Capture Beadsへの細胞外小胞の結合が不十分となる可能性があります。
推奨チューブミキサー：IKA社 MS3 Control (コードNo. 623-05671)

- 11) 10)の1.5mL容マイクロチューブ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。その後、上清をピペットで除く。
- 12) **WB (+Enhancer)** 300 μ Lを1.5mL容マイクロチューブに加えて3秒程度ボルテックスする。
- 13) 12)の1.5mL容マイクロチューブ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。その後、上清をピペットで除く。
- 14) 12)~13)の操作をさらに1回繰り返す。
- 15) **WB (+Enhancer)** 300 μ Lを加えて3秒程度ボルテックスする。…**細胞外小胞結合磁気ビーズ**

EDTA 血漿・クエン酸血漿サンプルの場合

- 8) ヘパリンナトリウム (Code: 085-00134) 10,000Uを精製水で溶解し、1,000U/mLヘパリンナトリウム溶液を作製する。
- 9) 7)の1.5mL容マイクロチューブに100 μ Lの**10,000 \times g 遠心分離上清画分**を加え、5秒程度ボルテックスする。
- 10) 1/200容量のヘパリンナトリウム溶液を添加する(終濃度5U/mL)。
- 11) 1/20容量のExosome Binding Enhancer (100 \times)を添加し、5秒程度ボルテックスする。
- 12) スピンドウンし、11)の1.5mL容マイクロチューブを室温で1時間静置する。その間、サンプル添加後20分、40分、1時間のタイミングで5秒程度ボルテックスして、磁気ビーズを攪拌する^{*5}。
- 13) 12)の1.5mL容マイクロチューブ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。その後、上清をピペットで除く。
- 14) 1/200容量のヘパリンナトリウム溶液を添加した**WB (+Enhancer)** 300 μ Lを13)の1.5mL容マイクロチューブに加えて、3秒程度ボルテックスする。
- 15) 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。その後、上清をピペットで除く。
- 16) **WB (+Enhancer)** 300 μ Lを加えて3秒程度ボルテックスする。
- 17) 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。その後、上清をピペットで除く。
18) **WB (+Enhancer)** 300 μ Lを加えて、3秒程度ボルテックスする。
…**細胞外小胞結合磁気ビーズ**

〔細胞外小胞の単離フロー (工程 2)〕

1.5mL容マイクロチューブ

+ 300 μ L **WB (+Enhancer)**
+ 30 μ L Exosome Capture Beads

ボルテックス

スピンドウン

磁気スタンド、1分間放置

上清を除去

+ 300 μ L **WB (+Enhancer)**

ボルテックス

スピンドウン

磁気スタンド、1分間放置

上清を除去

+ 100 μ L **10,000 \times g 遠心分離上清画分**
+ 1 μ L Exosome Binding Enhancer (100 \times)

※EDTA血漿・クエン酸血漿の場合

+ 100 μ L **10,000 \times g 遠心分離上清画分**
+ 1/200ヘパリンナトリウム溶液
+ 1/20 Exosome Binding Enhancer (100 \times)

室温で1時間静置 (20分、40分、1時間のタイミングでボルテックス)

スピンドウン

磁気スタンド、1分間放置

上清を除去

+ 300 μ L **WB (+Enhancer)** ※EDTA血漿・クエン酸血漿の場合
+ 300 μ L **WB (+Enhancer)**
+ 1/200ヘパリンナトリウム溶液
(初回のWashのみ)

ボルテックス

スピンドウン

磁気スタンド、1分間放置

上清を除去

+ 300 μ L **WB (+Enhancer)**

細胞外小胞結合磁気ビーズ

3. 細胞外小胞の染色

本工程は磁気ビーズ上に単離した細胞外小胞を蛍光標識抗体 (蛍光標識アライソタイプコントロール抗体もしくは蛍光標識エクソソーム表面抗原抗体)により染色する工程です。1.5mL容マイクロチューブを用いた反応系 (2反応分)を基本プロトコールとしています。細胞外小胞の単離工程において反応スケールを2反応分よりも大きくした場合は、本工程1)における**細胞外小胞結合磁気ビーズ**の分注本数を増やしてください。

- 1) 2本^{*6}の新しい1.5mL容マイクロチューブに**細胞外小胞結合磁気ビーズ**を100 μ Lずつ分注する。

※6 細胞外小胞の単離工程において、2反応分よりも大きいスケールで反応させた場合、**細胞外小胞結合磁気ビーズ**を分注する1.5mL容マイクロチューブの本数を、反応スケールに従って増やしてください。(例：細胞外小胞単離工程を6反応分で行った場合、6本の1.5mL容マイクロチューブに100 μ Lずつ分注する。)

- 2) 任意の蛍光標識アイソタイプコントロール抗体もしくは蛍光標識エクソソーム表面抗原抗体を添加して、3秒程度ボルテックスする^{*7}。

※7 良好な感度を得るためには抗体濃度の最適化が必要です。最初の実験では、抗体の製造販売元が推奨する1テストあたりの抗体使用量（例： 1×10^6 細胞あたりに使用する抗体量）を添加してください。

- 3) 2)の1.5mL容マイクロチューブを室温で1時間静置する。その間、蛍光標識抗体添加後20分、40分、1時間のタイミングで2)の1.5mL容マイクロチューブを5秒程度ボルテックスして、磁気ビーズを撹拌する^{*8}。

※8 チューブミキサーを使用される場合は、500rpm程度の回転速度で1時間撹拌してください。回転速度が速い場合、細胞外小胞への蛍光標識抗体の結合が不十分となる可能性があります。推奨チューブミキサー：IKA社 MS3 Control（コードNo. 623-05671）

- 4) 3)の1.5mL容マイクロチューブを卓上遠心機でスピンドダウンした後、専用磁気スタンドにセットし、約1分間静置する。その後、上清をピペットで除く。
 5) **WB (+Enhancer)** 300 μ Lを加えて3秒程度ボルテックスする。
 6) 5)の1.5mL容マイクロチューブを卓上遠心機でスピンドダウンした後、専用磁気スタンドにセットし、約1分間静置する。その後、上清をピペットで除く。
 7) 5)～6)の操作をさらに1回繰り返す。
 8) **WB (+Enhancer)** 300 μ Lを加えて3秒程度ボルテックスする^{*9}。

※9 ご使用のフローサイトメトリーの機器に合わせて、**WB (+Enhancer)**の添加量を調整してください。

- 9) フローサイトメトリーにより解析を行う^{*10,11}。

※10 フローサイトメトリーによる解析を行う際は、以下の図1のように前方散乱光 (FS) と側方散乱光 (SS) のプロット図から磁気ビーズが凝集していない画分をゲーティングし、ゲート内に含まれる磁気ビーズの蛍光強度を比較してください。

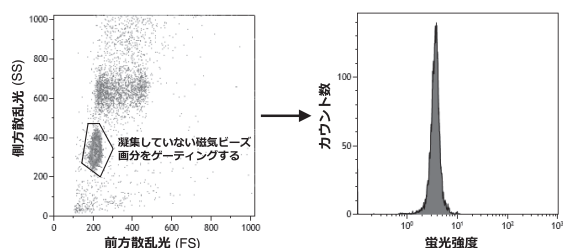
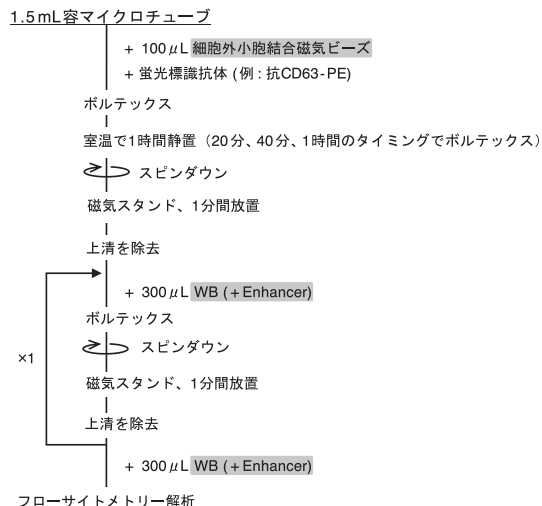


図1 フローサイトメトリーを用いた細胞外小胞の解析手順

※11 セルストレナーを使用することにより、ビーズの凝集を軽減できる可能性があります。(Falcon[®] 5mL Round Bottom Polystyrene Test Tube, with Cell Strainer Snap Cap, コードNo. 643-50461 など。)

〔細胞外小胞の染色フロー（工程3）〕



〔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
299-77603	MagCapture™	2 回用
293-77601	エクソソームアイソレーションキット PS	10 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 キット (0.5 mL Slurry)
012-27063	抗 CD63, モノクローナル抗体 (3-13)	100 μ L
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
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
019-27713	抗 CD63, モノクローナル抗体 (3-13),	100 μ L
	ビオチン結合	
014-27763	抗 CD9, モノクローナル抗体 (1K)	100 μ L
013-27951	抗 CD9, ラットモノクローナル抗体 (30B),	20 μ L
019-27953	ビオチン結合	100 μ L
011-27773	抗 CD81, モノクローナル抗体 (17B1)	100 μ L
052-09301	エクソソーム, COLO201 細胞由来, 精製品	50 μ L
058-09261	EV-Save™ 細胞外小胞プロッキング試薬	1mL
085-00134	ヘパリンナトリウム	10,000U
317-90175	10 \times TBS (pH 7.4)	500mL
290-35591	マグネットスタンド	1 式
623-05671	MS 3 Control (tube mixer)	1 式

【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.J. 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. Jin, *et al.*, *Stem Cell Res. Ther.*, **10** (1), 95 (2019).
- 18) Z. Liu, *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).
- 22) W. Ando, *et al.*, *Sci. Rep.*, **9** (1), 13595 (2019).
- 23) S. Muraoka, *et al.*, *Front. Neurosci.*, **13**, 1059 (2019).
- 24) K. Yuyama, *et al.*, *Sci. Rep.*, **9**, 16827 (2019).
- 25) L. Sun, *et al.*, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2019**, 4506303 (2019).
- 26) G. Lou, *et al.*, *J. Exp. & Clin. Cancer Res.*, **39**, 4 (2020).
- 27) C-Y. Liu, *et al.*, *CNS Neurosci. Ther.*, **26** (2), 189-196 (2020).
- 28) S. Muraoka, *et al.*, *Methods*, *in press* (2020).
- 29) J. Jin, *et al.*, *Biomed. Res. Int.*, **2020**, Article ID 2685305 (2020).

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