

# ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Green

## ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Red

## ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red

### Technical Manual

#### はじめに

近年、細胞から分泌される細胞外小胞 (Extracellular vesicle ; EV) の一種であるエクソソームががんの悪性化や転移に促進的に関与することが明らかとなり、注目を集めています。エクソソームによる細胞間コミュニケーションを解析するためには、細胞への取り込みをモニタリングする技術が重要であり、細胞外小胞の脂質二重膜蛍光染色色素を用いた標識技術が汎用されています。本製品はこれまでの膜色素の課題であった①染色後のエクソソーム粒子径の増加<sup>1)</sup>、②色素自体の粒子形成によるバックグラウンドの上昇<sup>2)</sup>を抑えた新規の脂質二重膜蛍光染色色素です。蛍光色として Green, Red, Deep Red を取り揃えており、多重染色による様々な実験系への適応が可能です。

#### 内容

	染色用色素	Filtration Tube
EX01 ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Green	Mem Dye-Green x 1 本	x 5 本
EX02 ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Red	Mem Dye-Red x 1 本	x 5 本
EX03 ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red	Mem Dye-Deep Red x 1 本	x 5 本

#### 保存条件

遮光、0 - 5 °C で保存してください。

#### 必要なもの

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- PBS
- マイクロピペット
- マイクロチューブ
- 遠心機

#### 溶液調製

##### Mem Dye stock solution の調製

Mem Dye-Green, Red, Deep Red の入ったチューブに DMSO 10 µl を入れ、ボルテックスミキサーで良く溶解する。  
溶解後の Mem Dye stock solution を保存するには 2 µl ずつを新しいチューブに分注し、-20 °C 以下で保存してください。

**\* 凍結融解の繰り返しにより色素が劣化するため、凍結融解後は保存できません。**

#### 操作

##### 細胞準備

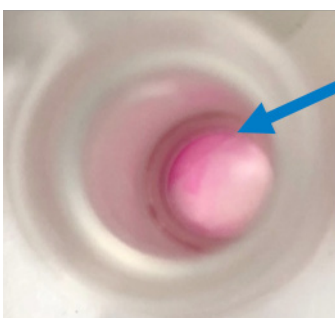
1. 細胞をディッシュに播種し、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37 °C で任意の時間培養する。

##### エクソソーム染色

表 1. 染色時のエクソソーム量目安

タンパク質量	1 - 10 µg
粒子数	10 - 100 x 10 <sup>8</sup> 個

- \* 上記エクソソーム量は超遠心法で得たエクソソームを用いた際の目安になります。
  - \* エクソソームの精製条件や由来細胞種により染色に必要なエクソソーム量は異なるため、はじめて染色される際には必ず使用するエクソソーム量をご確認ください。
  - \* ポリマー沈殿法により得たエクソソームは、残存するポリマーの影響を受けるため、本キットでの染色はできません。
2. PBS で懸濁したエクソソーム 100 µl をマイクロチューブに入れる。
  3. Mem Dye stock solution 2 µl を操作 2. の溶液に入れボルテックスミキサーで良く攪拌する。
  4. 37 °C で 30 分間インキュベーションする。
  5. フィльтраーションチューブにインキュベーション後の溶液を全量移す。
  6. 室温で 3000xg、5 分間遠心する。
  7. PBS 100 µl をフィルトレーションチューブに入れる。
  8. 室温で 3000xg、5 分間遠心する。
  9. 操作 7. および 8. を再度繰り返す。
  10. 残存する溶液を通過するために再度室温で 3000xg、5 分間遠心する。
  - \* 3000xg 以上で遠心操作を行うとエクソソームもフィルターを通過し回収量が低下します。溶液が残存する際には溶液がすべて通過するまで遠心操作を繰り返してください。
  11. PBS 50 µl をフィルトレーションチューブに入れ、フィルター上の未反応色素に直接チップの先が触れないよう注意深くピペティングし、回収した染色済みエクソソームを、新しいマイクロチューブに移す。
  - \* フィルター上には未反応の色素も保持されているため、直接チップの先で残存色素に触れるとコンタミの原因になります。



フィルター上に保持された未反応色素  
⇒ この部分にチップの先が直接触れないように  
PBS を入れて回収する

## 細胞へのエクソソームの添加

12. 培地を取り除き、PBS で 1 回洗浄する。
13. PBS を取り除き、新しい血清含有培地を加える。
14. 回収した染色済みエクソソーム 1 – 50  $\mu\text{l}$  を細胞に添加し、5%  $\text{CO}_2$  存在下、37  $^\circ\text{C}$  で 1 – 24 時間インキュベーションする。
15. 上澄みを取り除き、PBS で 2 回洗浄する。
16. PBS を取り除き、新しい血清含有培地を加え、蛍光顕微鏡で観察する。

## 実験例 HeLa 細胞を用いたエクソソーム添加量、インキュベーション時間による蛍光強度変化観察

1.  $\mu\text{-slide}$  8 well plate (ibidi) に HeLa 細胞 ( $1.25 \times 10^4$  cells/well) を播種し、5%  $\text{CO}_2$  存在下、37  $^\circ\text{C}$  で一晩インキュベーションした。
  2. 培地を除き、PBS で 1 回洗浄し、新たな 10% FBS 含有 DMEM 培地を 200  $\mu\text{l}$  加えた。
  3. エクソソーム\* を各種色素で染色し (5, 10  $\mu\text{g}$  protein 相当量。粒子数では 50, 100  $\times 10^8$  個)、全量を HeLa 細胞に添加した。
  4. 5%  $\text{CO}_2$  存在下、37  $^\circ\text{C}$  で 2 もしくは 4 時間インキュベーションした。
  5. 培地を取り除き、PBS で 2 回洗浄した。
  6. PBS を取り除き、新しい 10% FBS 含有 DMEM 培地を 200  $\mu\text{l}$  入れ、蛍光顕微鏡で観察した。
- \* エクソソームは浮遊性 HEK293 細胞の培養上清から超遠心法で精製し、使用した。  
タンパク量は BCA 法、粒子数はナノ粒子トラッキング解析 (NTA) にて測定した。

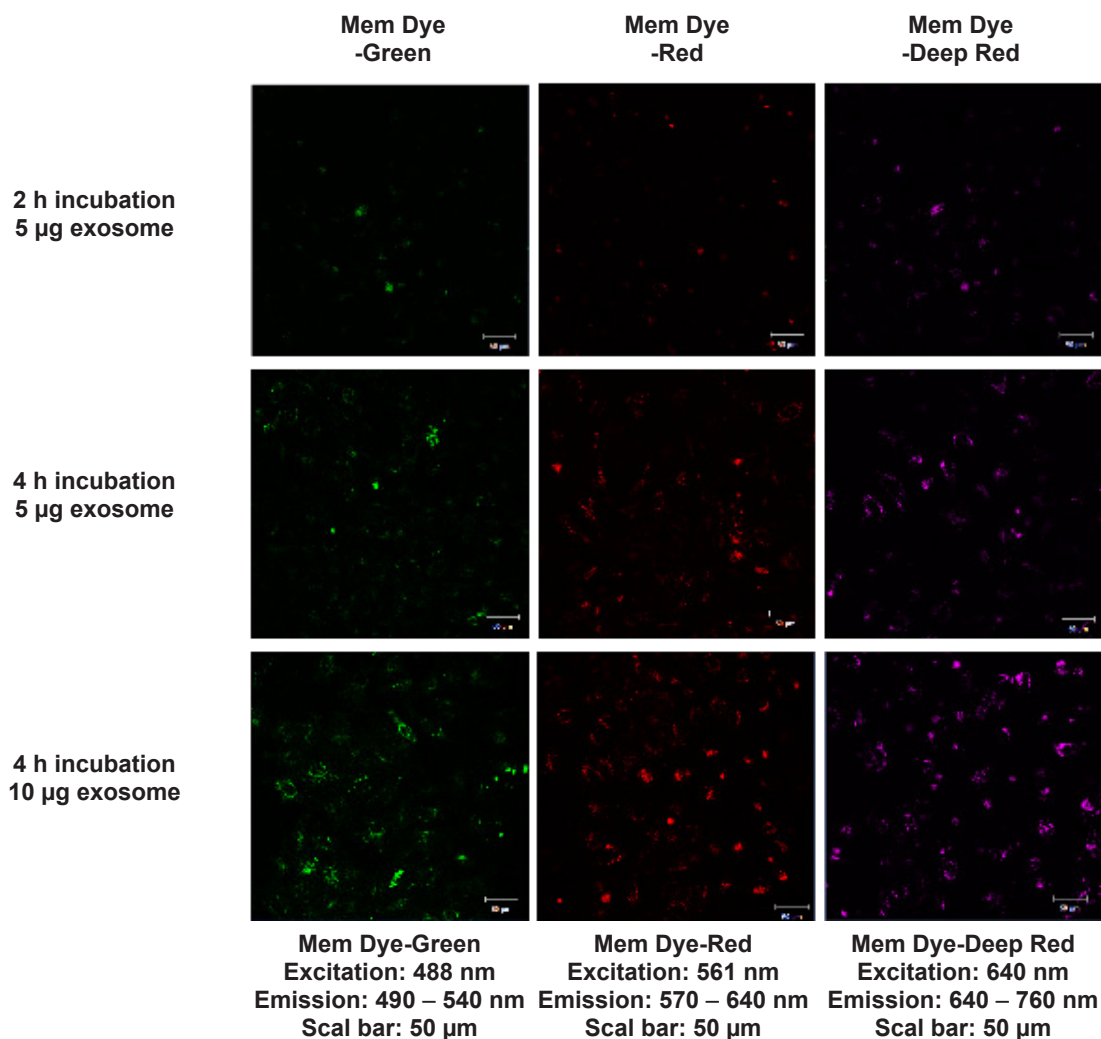


図 1 エクソソーム添加量およびインキュベーション時間による取り込み量の変化

\* 上記データは京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 秋吉一成先生のご支援のもと取得いたしました。

## 参考文献

- 1) Dehghani, M. et al., *bioRxiv*, **2019**, doi:<https://doi.org/10.1101/532028>
- 2) Dominkus, P. P. et al., *Biomembranes* **2018**, 1860, 1350 – 1361.

本製品は試験・研究用途です。臨床診断用途には使用できません。  
ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

**DOJINDO** 株式会社同仁化学研究所  
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5  
熊本テクノリサーチパーク 〒 861-2202  
Tel: 096-286-1515 (代表) Fax: 096-286-1525  
E-mail: [info@dojindo.co.jp](mailto:info@dojindo.co.jp) URL: [www.dojindo.co.jp](http://www.dojindo.co.jp)

ドージン・イースト (東京)  
東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒 105-0012  
Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650  
フリーダイヤル : 0120-489548  
フリーファックス : 0120-021557

EX01: ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Green  
EX02: ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Red  
EX03: ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red