

《研究用試薬》

MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS**1. 製品情報**

コード No.	製品名	容量	保存条件
293-96401	MagCapture™ EV Isolation Kit PS for HTS	96 回用	冷蔵

2. キット内容

構成品	容量	保存条件
EV Capture Magnetic Beads	5.8mL	冷蔵 (2~10℃)
EV Washing Buffer (10×)	90mL	冷蔵 (2~10℃)
EV Binding Enhancer (500×)	3mL	冷蔵 (2~10℃)
EV Elution Buffer (10×)	3mL	冷蔵 (2~10℃)

3. 製品概要

本品は、ホスファチジルセリン (PS) に結合するタンパク質 (Tim4) と磁気ビーズを用いたアフィニティー法 (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などの細胞外小胞 (EV) を高純度かつ簡便に単離できるキットです。従来、多くのサンプルから一度に EV 単離精製を行うことには煩雑な作業と時間が必要でした。本品は、Tim4 を予め固相化した磁気ビーズと Thermo Fisher Scientific 社の KingFisher™ Flex のような磁気ビーズを用いた自動単離装置に最適化させた試薬組成で新たに構成され、多検体から EV を単離精製することを目的としたハイスループットスクリーニング (HTS) に対応できます。

4. 本品以外に準備するもの

* : 操作方法をご確認のうえ、必要に応じてご用意いただく試薬および器具

(1) 試薬

- EV-Save™ シリーズ*
 - EV-Save™ 細胞外小胞ブロッキング試薬 (#058-09261)
 - in vivo* 用 EV-Save™ 細胞外小胞ブロッキング試薬 (#050-09461)
- 超純水

(2) 器具

- 冷却式遠心分離機 (Max > 10,000×g)
- ボルテックスミキサー
- 卓上遠心機
- マイクロピペット
- ピペットチップ
- KingFisher™ Flex および Presto 用ディープウェル、チップコームおよびプレート
スタートサンプル量にあわせて最適なもの下記よりご選択下さい。
 - ・ サンプル量が 1,000µL 以下の場合：
KingFisher™ Plastics for 96 deep-well format (Thermo, #97002820)
 - ・ サンプル量が 1,000µL~5,000µL の場合：
KingFisher™ Plastics for 24 deep-well format (Thermo, #97002610)
- 1.5mL マイクロチューブ*
- 15mL/50mL 遠沈管*
- 遠心式限外濃縮ユニット*
例：VIVASPIN 6, MWCO 100,000, PES (Sartorius, #VS0641)
VIVASPIN 20, MWCO 100,000, PES (Sartorius, #VS2041)
- 遠心式フィルターユニット*
例：Ultrafree-MC, GV 0.22µm, 滅菌済 (Millipore, #UFC30GV0S)
Ultrafree-MC, GV 0.45µm, 滅菌済 (Millipore, #UFC30HV00)

5. 操作方法

① サンプルの前処理

推奨・注意事項

- ・ エクソソームとその他の細胞外小胞（マイクロベジクル等の Large EVs を含む）を取得したい場合、以下プロトコルに従い、1,200×g 遠心分離上清画分を調製してください。
- ・ エクソソームをより高純度を取得したい場合、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}
- ・ 血清、血漿以外の体液サンプルを用いる場合、下記プロトコルを参考に前処理プロトコルおよび実験条件をご検討ください。

※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等のメンブレンフィルター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。
- ✓ エクソソームとその他の細胞外小胞（マイクロベジクル等の Large EVs を含む）を取得する場合
- (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）。
- ✓ エクソソームをより高純度を取得する場合
- (5) 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）。
 - (6) (5)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 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（使用培地、スケール、培養期間等）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 FBS 由来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（Exosome-Depleted FBS, #558-39501）をご使用ください。

【血清・ヘパリン血漿の場合】

- (1) 血清・ヘパリン血漿を遠沈管やチューブへ分注する。
- ✓ エクソソームとその他の細胞外小胞（マイクロベジクル等の Large EVs を含む）を取得する場合
- (2) 4℃、1,200×g で 20 分間遠心分離する（夾雑物の分離）。
 - (3) (2)の上清を新しい遠沈管やチューブに移す（1,200×g 遠心分離上清画分^{※3}）。
- ✓ エクソソームをより高純度を取得する場合
- (2) 10,000×g、4℃で 30 分間遠心分離する。^{※4}
 - (3) (2)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）。^{※5}

【EDTA 血漿・クエン酸血漿の場合】

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固剤が細胞外小胞と EV Capture Magnetic 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、「③KingFisher™ Flex を用いた EV 単離精製手順 > 2. サンプル調製 > 【EDTA 血漿・クエン酸血漿の場合】」に記載がございます。

(1) EDTA/クエン酸血漿を遠沈管やチューブへ分注する。

✓ エクソソームとその他の細胞外小胞（マイクロベジクル等の Large EVs を含む）を取得する場合

(2) 4℃、1,200×g で 20 分間遠心分離する（夾雑物の分離）。

(3) (2)の上清を新しい遠沈管やチューブに移す（1,200×g 遠心分離上清画分^{※3}）。

✓ エクソソームをより高純度を取得する場合

(2) 10,000×g、4℃で 30 分間遠心分離する。^{※4}

(3) (2)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^{※5}）。

※3 1,200×g 遠心分離上清画分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 の遠心分離処理したものをエクソソーム+ Large EVs 精製用サンプルとしてご使用ください。

※4 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。

※5 脂質成分の沈殿が混入する場合は、0.45 μm のメンブレンフィルターろ過で沈殿を除去できます。

②Buffer 調製

注意事項

・ 1 サンプルを処理するために必要な各種 Buffer の量は以下の通りです。

EV Washing Buffer (1×) ・ ・ 4 mL (調液量 : 5 mL)

EV Elution Buffer (1×) ・ ・ ・ 100 μL (調液量 : 150 μL) ※96 deep well plate を使用する場合
200 μL (調液量 : 250 μL) ※24 deep well plate を使用する場合

・ Buffer 調製に用いる遠沈管等の容器はキットに付属しておりません。

(1) 遠沈管等の容器に EV Washing Buffer (10×) 0.5 mL と超純水 4.5 mL を添加し、さらに EV

Binding Enhancer (500×) を 10 μL 添加して EV Washing buffer (1×) を調製する。^{※6}

- (2) 遠沈管等の容器に EV Elution Buffer (10×) 15 μL と超純水 135 μL を添加し、EV Elution buffer (1×) を調製する。^{※7}
- (3) (1)と(2)共に良く混合し、使用するまで室温で保管する。

※6 EV Washing Buffer (1×) に EV Binding Enhancer (500×) を未添加の場合、エクソソームの回収効率が著しく低下する恐れがありますので、必ず添加してください。

※7本工程で使用する EV Elution Buffer に、別売の EV-Save™ シリーズを添加することで、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。

③KingFisher™ Flex を用いた EV 単離精製手順

本プロトコルでは Thermo Fisher Scientific 社の KingFisher™ Flex と 96 deep well plate を用いた EV 単離精製方法をご紹介します。

反応プログラム等の設定方法等は、装置および専用ソフトのプロトコルに準じて行うことを推奨します。

1. プレート・チップコームの準備

■アフィニティー反応から溶出まで一連処理する場合 (3-1 参照)

96 deep well plate を 7 枚と Tip comb を 1 枚用意する。

■アフィニティー反応と溶出工程を別に実施する場合 (3-2 参照)

96 deep well plate を 8 枚と Tip comb を 2 枚用意する。

2. サンプル調製

【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/アッセイ) を 1.5 mL マイクロチューブ等の容器に必要量準備する。
- (2) サンプルに対して 1/500 容量の EV Binding Enhancer (500×) を添加し、ボルテックスミキサーで混合する。…EV Binding Enhancer (1×) 添加済みサンプル

【EDTA 血漿・クエン酸血漿の場合】

- (1) ヘパリンナトリウム (#085-00134) 10,000U を超純水で溶解し、1,000U/mL ヘパリンナトリウム溶液を作製する。
- (2) サンプル (最大容量 : 1 mL/アッセイ) を 1.5mL マイクロチューブ等の容器に必要量準備する。

- (3) 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 5U/mL）。
- (4) (3)に対して 1/100 容量の EV Binding Enhancer（500×）を添加し、ボルテックスミキサーで混合する。…EV Binding Enhancer（5×）添加済みサンプル

3. EV の単離精製

3-1. アフィニティー反応から溶出まで一連処理する場合

アフィニティー反応から溶出までの一連工程を通して行う場合の Protokol です^{※8}。

- (1) 96 deep well plate に Tip comb をセットする。このプレートは専用ソフト BINDIT のレイアウト設定で **TIP1** と設定する^{※9}。
- (2) 新しい 96 deep well plate の任意のウェルポジションに、ボルテックスでよく攪拌・懸濁した EV Capture Magnetic Beads 60 uL と EV Washing Buffer（1×）940 uL を添加する。
このプレートは専用ソフト BINDIT のレイアウト設定で **DWP1_Beads** と設定する。
- (3) 新しい 96 deep well plate の(2)と同じウェルポジションに、「2.サンプル調製」で調製したサンプルを添加する。
このプレートは、専用ソフト BINDIT のレイアウト設定で **DWP2_sample** と設定する。
- (4) 新しい 96 deep well plate を 3 枚用意し、(2)と同じウェルポジションに EV Washing Buffer（1×）を 1mL ずつ添加する。
このプレートは専用ソフト BINDIT のレイアウト設定で **DWP3_Washing, DWP4_Washing, DWP5_Washing** とそれぞれ設定する。
- (5) 新しい 96 deep well plate の(2)と同じウェルポジションに、EV Elution Buffer（1×）を 100 uL 添加する。
このプレートは専用ソフト BINDIT のレイアウト設定で **DWP6_Elution** と設定する。
- (6) KingFisher™ Flex とソフトを立ち上げて、事前に設定した Protokol を Run する。
処理プログラムは^{※10}に記載の設定条件を参考に作成してください。サンプル種やサンプルボリュームにより最適なサンプル反応時間が異なるので、適宜反応時間を検討、調整してください^{※11}。
- (7) 各プレートとチップをセットし、処理プログラムを開始する。
- (8) プログラム終了後、プレートとチップを装置から回収する。**DWP6_Elution** のウェルプレートの溶液が EV サンプルとなる。それ以外のプレートおよびチップは適切に廃棄する。

※8 KingFisher™ヘプレートをセットする順番

①TIP1→②DWP6_Elution→③DWP5_Washing→④DWP4_Washing→⑤DWP3_Washing→⑥DWP2_Sample
→⑦DWP1_Beads

※9 KingFisher™ Flex の専用ソフト BINDIT のレイアウト設定 (DWP1_Beads の設定例)

項目	設定内容	備考
Plate name:	DWP1_Beads	任意の名称に変更可
Plate type:	96DW plate	使用プレートを選択
Reagent name:	Beads mix	
Total vol.:	1000µL	1wellあたりの溶液量
Color:	Blue	任意の色を選択
Type:	reagent	

※10 KingFisher Flex 専用ソフト BINDIT のプログラム設定例

Tip1 : 96 DW tip combを選択

Pick-Up Tip*

Wash 0 (Plate: DWP1_Beads*)

設定条件

Mixing Time:	Fast 15sec, Medium 15sec, Loop count 1
End of step:	Collect beads, count 5, Collect time 20sec

Mix (Plate: DWP2_Sample*)

設定条件

Beginning of step:	Release beads, speed Fast
Mixing Time:	Medium 10sec, Slow 50sec, Loop count 10
End of step:	Postmix 10sec, speed Medium Collect beads, count 5, Collect time 20sec

Wash1 (Plate: DWP3_Washing*)

設定条件

Beginning of step:	Release beads, speed Fast
Mixing Time:	Medium 30sec, Loop count 1
End of step:	Collect beads, count 5, Collect time 20sec

Wash2 (Plate: DWP4_Washing*)

設定条件

Beginning of step:	Release beads, speed Fast
Mixing Time:	Medium 30sec, Loop count 1
End of step:	Collect beads, count 5, Collect time 20sec

Wash3 (Plate: DWP5_Washing*)

設定条件

Beginning of step:	Release beads, speed Fast
Mixing Time:	Medium 30sec, Loop count 1
End of step:	Collect beads, count 5, Collect time 20sec

Dry (Plate: DWP5_Washing*)

設定条件

Dry time:	1min
Tip position:	Above well/tube surface

Elution (Plate: DWP6_Elution*)

設定条件

Beginning of step:	Release beads, speed Fast
Mixing Time:	Fast 10sec, Paused 10min, Fast 10sec, Loop count 1
End of step:	Collect beads, count 5, Collect time 20sec

Leave Tip : 96 DW tip combを選択

※レイアウトで設定した Tip/Well を選択する

※11 サンプル反応時間を延長させる場合は、BINDIT プロトコル設定の Mix 工程で Loop count や Mixing Time を延長してください。

3-2. アフィニティー反応と溶出工程を別に実施する場合※12

アフィニティー反応と溶出工程を別々のプログラムで実施する場合のプロトコルです。溶出時に用いる TIP comb を新しくするため、サンプル中の夾雑物質のキャリーオーバーを低減できる効果が期待されます。

- (1) 96 deep well plate に Tip comb をセットする (2 セット用意)。

このプレートは専用ソフト BINDIT のレイアウト設定で **TIP1** と **TIP2** と設定する※8。

- (2) 96 deep well plate の任意のウェルポジションに、ボルテックスでよく攪拌・懸濁した EV Capture Magnetic Beads 60 µL と EV Washing Buffer (1×) 940 µL を添加する。このプレートは専用ソフト BINDIT のレイアウト設定で **DWP1_Beads** と設定する。

- (3) 96 deep well plate の(2)と同じウェルポジションに、「2.サンプル調製」で調製したサンプルを添加する。

このプレートは専用ソフト BINDIT のレイアウト設定で **DWP2_sample** と設定する。

- (4) 96 deep well plate を 3 プレート用意し、(2)と同じウェルポジションに EV Washing Buffer (1×) を 1 mL 添加する。

このプレートは専用ソフト BINDIT のレイアウト設定で **DWP3_Washing**, **DWP4_Washing**, **DWP5_Washing** とそれぞれ設定する。

- (5) 96 deep well plate の(2)と同じウェルポジションに、EV Elution Buffer (1×) を 100µL 添加する。このプレートは専用ソフト BINDIT のレイアウト設定で **DWP6_Elution** と設定する。

- (6) KingFisher™ Flex とソフトを立ち上げて、事前に設定したアフィニティー反应用のプロトコルを Run する。

処理プログラムは※13 に記載の設定条件を参考に作成してください。サンプル種やサンプルボリュームにより最適なサンプル反応時間が異なるので、適宜反応時間を検討、調整してください。

- (7) 各プレートとチップをセットし処理プログラムを開始する。

- (8) プログラム終了後、プレートとチップを装置から回収する。**DWP5_Washing** のウェルプレートに洗浄済み磁気ビーズが回収されているため、次の溶出工程で使用するまで保管する。それ以外のプレートおよびチップは適切に廃棄する。

- (9) 事前に設定した溶出工程用のプロトコルを Run する※14。

- (10) 新しい Tip comb (**TIP2**)と **DWP5_Washing** ((8) で回収)、**DWP6_Elution** のウェルプレートをセットし処理を開始する。

(11) プログラム終了後、プレートとチップを装置から回収する。**DWP6_Elution** のウェルプレートの溶液が EV サンプルとなる。それ以外のプレートおよびチップは適切に廃棄する。

※12 KingFisher™ヘプレートをセットする順番

【サンプル反応工程】

①TIP1→②DWP5_Washing→④DWP4_Washing→⑤DWP3_Washing→⑥DWP2_Sample→⑦DWP1_Beads

【溶出工程】

①TIP2→②DWP6_Elution→④DWP5_Washing

※13 KingFisher™ Flexの専用ソフト BINDIT のプログラム設定例(アフィニティー反応)

Tip1 : 96 DW tip combを選択

Pick-Up Tip (Tip: Tip1*)

Wash 0 (Plate: DWP1_Beads*)

設定条件

Mixing Time:	Fast 15sec, Medium 15sec, Loop count 1
End of step:	Collect beads, count 5, Collect time 20sec

Mix (Plate: DWP2_Sample*)

設定条件

Beginning of step:	Release beads, speed Fast
Mixing Time:	Medium 10sec, Slow 50sec, Loop count 10
End of step:	Postmix 10sec, speed Medium Collect beads, count 5, Collect time 20sec

Wash1 (Plate: DWP3_Washing*)

設定条件

Beginning of step:	Release beads, speed Fast
Mixing Time:	Medium 30sec, Loop count 1
End of step:	Collect beads, count 5, Collect time 20sec

Wash2 (Plate: DWP4_Washing*)

設定条件

Beginning of step:	Release beads, speed Fast
Mixing Time:	Medium 30sec, Loop count 1
End of step:	Collect beads, count 5, Collect time 20sec

Wash3 (Plate: DWP5_Washing*)

設定条件

Beginning of step:	Release beads, speed Fast
Mixing Time:	Medium 30sec, Loop count 1

Leave Tip : 96 DW tip combを選択

※ レイアウトで設定した Tip/Well を選択する

※14 KingFisher™ Flex の専用ソフト BINDIT のプログラム設定例 (溶出工程)

Tip2 : 96 DW tip combを選択

— **Pick-Up Tip (Tip: Tip2*)**

— **Collect Beads (Plate: DWP5_Washing*)**

設定条件

Collect beads, count 5, Collect time 30sec

— **Dry (Plate: DWP5_Washing*¹⁰)**

設定条件

Dry time: 1min

Tip position: Above well/tube surface

— **Elution (Plate: DWP6_Elution*)**

設定条件

Beginning of step: Release beads, speed Fast

Mixing Time: Fast 10sec, Paused 10min, Fast 10sec, Loop count 1

End of step: Collect beads, count 5, Collect time 30sec

Leave Tip : 96 DW tip combを選択

※ レイアウトで設定した Tip/Well を選択する