

当社検討で5mL容量 MassivEV™ EV Purification Column PS（製品コード：137-19493）でサンプル反応時の流速を2倍にして使用可能であることが確認されました。

従来のプロトコルの流速上限を上げるように記載しております。

【留意点】

- ・この時短プロトコルは、5mL容量 MassivEV™ EV Purification Column PS（製品コード：137-19493）のみに適応です。
- ・流速を上げた場合、サンプル、精製回数によっては取りこぼしが発生する可能性があります。

【従来版と比較した場合の変更点】

①バッファー種

洗浄液をEV binding enhancer/Wash bufferで統一することで使用するバッファー種を4種から3種に低減しました。

②流速

洗浄およびサンプル反応について2倍の流速で実施することで作業時間を短縮しました。

	使用バッファー量 (mL)	使用バッファー種	従来プロトコル		短縮プロトコル	
			流速(mL/min)	所要時間(分)	流速(mL/min)	所要時間(分)
洗浄	50	EV Binding Enhancer /Washing Buffer (1×)	4.25	11.8	6	8.3
サンプル反応	1000	(-)	3	333.3	6	166.7
洗浄	100	EV Binding Enhancer /Washing Buffer (1×)	4.25	23.5	6	16.7
溶出	20	Elution /EV-Stabilizer Buffer (1×)	1	20.0	1	20.0
洗浄	50	EV Binding Enhancer /Washing Buffer (1×)	4.25	11.8	6	8.3
保管	10	20%エタノール /Storage Buffer (1×)	4.25	2.4	4.25	2.4
			合計(時間)	6.7		3.7

《研究用試薬》

MassivEV™ EV Purification Column PS

[使用前にご確認下さい]

当プロトコルは本製品をより短時間、簡略化したハンドリングでご使用いただく方法となります。

使用する製品は137-19493（5mL）のみが対象となります。

本製品使用前にご準備いただく試薬、操作内容が異なりますので従来法と使用方法の違い、留意点をご理解いただいたうえでご利用下さい。

【製品情報】

コード No.	製品名	容量	保存条件
137-19493	MassivEV™ EV Purification Column PS	5 mL	冷蔵

【概要】

本製品は、細胞外小胞（EV）精製用カラムです。細胞培養上清から高純度な EV を PS アフィニティ一法によって簡便に精製できます。EV の膜表面に存在するホスファチジルセリン（PS）にカルシウム依存的に結合する物質を応用しているため、キレート剤によりインタクトな状態で EV を溶出することができます。本製品の動的結合容量*の目安は、次のとおりです。

5 mLカラム: 2.5×10^{12} particles/5 mL レジン

*当社が 間葉系幹細胞（MSC）由来EVを用いて設定した条件で測定した値のため、条件によっては変化する場合があります。

【本品以外に準備するもの（□: チェック欄）】

1. 試薬

- 295-96601 MassivEV™ Purification Buffer Set
- 培地（細胞増殖用培地/EV 産生用培地）
 - 例) 132-19345 MSCulture™ High Growth 基礎培地
 - 133-19331 MSCulture™ High Growth サプリメント
 - 053-09451 EV-Up™ MSC EV 産生用基礎培地
 - 298-84001 EV-Up™ MSC EV 産生用サプリメント
- 99.5%エタノール
- 超純水

2. 器具

必ず必要なもの

- ペリスタポンプ（例：Repligen # ACJR-U10-R）
- ジョイントパーツ（例：Cytiva #18111251）
- 送液用チューブ（例：ヤマト科学 #06435-14やBio-Rad #7318215、およびBio-Rad#7318215）
- 接続用バンプ2種（例：Bio-Rad #7318222とBio-Rad #7318225）
- 回収用チューブ（例：Corning #430791）

・詳細は当社製品HP掲載のサポート資料をご確認ください

FAQサポート資料: MassivEV EV Purification Column PS における精製システム例

(<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0113-1949.html>)

・以下の器具は、手法によって要、不要が異なります。操作方法をご確認ください。

- 遠心機
- セルストレーナー（例：FALCON #352340）
- 5 μm フィルター（例：GVS #1215396）
- 0.8 μm フィルター（例：GVS #1214568）
- 0.22 μm フィルター（例：Corning #431118）
- インキュベーターもしくはウォーターバス（37℃加温できるもの）
- Reusable Filter Units（上記5μm/0.8μmフィルターで処理する場合必要 例：Thermo#300-4050PK）
- 限外ろ過膜【100kDa/PES 素材】（例：ザルトリウス #VS0141）
- ゲル濾過カラム（例：PD SpinTrap G-25）

【試薬の準備】

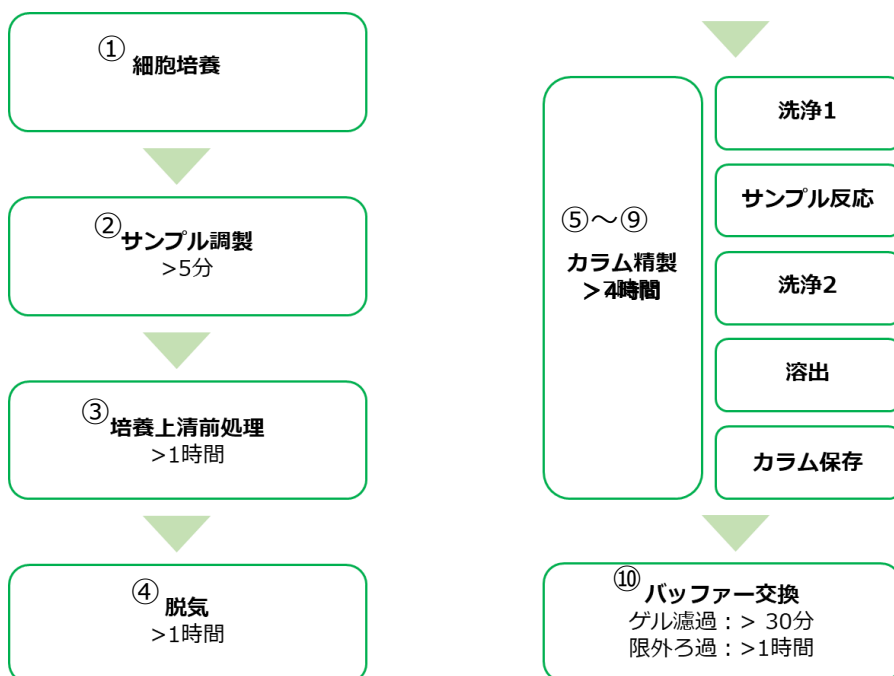
1. EV Binding Enhancer/Washing Buffer（1×）の調製
超純水 180 mL に対して、20 mL の Washing Buffer（10×） および 2 mL の EV Binding Enhancer（100×）を添加する。
2. EV Elution Buffer（1×）の調製
18 mL の超純水に 2 mL の EV Elution Buffer（10×）を添加する。
3. EV-Stabilizer/Elution Buffer（1×）の調製
EV 溶出後のバッファー交換手法に応じて、EV Elution Buffer（1×）に 1/100 量の EV-Stabilizer A あるいは B を添加する。
20 mL の EV Elution Buffer（1×）に 200 μL の EV-Stabilizer A もしくは B を添加

バッファー交換手法	効果	添加する EV-Stabilizer	動物への投与
(A)ゲル濾過	バッファー交換のみ	A	可
(B)限外ろ過	バッファー交換・濃縮	B	推奨しない

4. 20%エタノール/Storage Buffer (1×) の調製

7 mL の超純水に 1 mL の Storage Buffer (10×) と 2 mL の 99.5%エタノールを添加する。

【工程フロー】



【操作方法】

① 細胞培養

- (1) 任意の細胞の増殖培養と EV 産生培養を行う。
- (2) 任意の細胞の培養上清を回収する。
- (3) 必要に応じて冷蔵 (2-10℃) もしくは冷凍 (-20℃以下) で保存する。

- ・ EV 産生培地に血清培地を使用した場合、不純物がレジンに吸着し、レジンの性能劣化が早まる可能性があります。そのため、EV 産生用培地は無血清培地の使用を推奨します。

② EV Binding Enhancer の添加

- (1) ①の培養上清に EV Binding Enhancer (100×) を 1/100 になるように添加する。

- ・ 培地にカルシウムが 2mM 以上含まれている場合は添加不要です。
- ・ 培地中のカルシウム濃度が不明の場合は添加することを推奨いたします。
- ・ 過剰にカルシウムを添加することで析出物が生じることがありますが、後工程のフィルター処理で除去することが可能です。

③ 培養上清前処理

夾雑物を除去するために、以下のいずれかの方法で前処理を実施してください。

A. 遠心分離による前処理の場合

- (1) ②の培養上清を遠心分離処理 (5,000×g, 20 分間) する。
- (2) 上清を回収する。
- (3) (2)を 0.8 μm フィルター濾過処理する。

- ・ PES 素材のフィルター使用を推奨いたします。
- ・ 遠心処理速度は当社検討の実績です。次の脱気工程で 0.22 μm フィルター濾過処理が実施可能であれば、その他の遠心速度(例：10,000×g 60 分間)でも遠心分離処理が可能です。

B. フィルターによる前処理の場合

- (1) ②の培養上清を 40 μm セルストレーナーで濾過処理する。
- (2) (1)の濾液を 5 μm フィルター濾過処理する。
- (3) (2)の濾液を 0.8 μm フィルター濾過処理

- ・ PES 素材フィルターの使用を推奨いたします。

④ 培養上清の脱気

- (1) ③の前処理済み培養上清を室温以上の温度（25-28℃）になるように 37℃のインキュベーターもしくはウォーターバスで加温する。
- (2) 0.22 μm フィルター濾過処理する。

- ・ 冷蔵保存していたサンプルを室温に戻す際に気化した液体中の空気がカラムへのエア混入の原因になることがあります。そのため、必ず加温後のサンプル温度が室温より高くなることを確認してください。
- ・ PES 素材フィルターの使用を推奨します。

⑤ カラム精製 - 洗浄 1

カラムへのエア混入を避けるため、以降のカラム精製工程（⑤~⑨）ではバッファーを室温に戻してからご使用下さい。

- (1) カラムを冷蔵庫から取り出して 10 分程度静置し、室温に戻す。
- (2) ベリスタポンプを使用して 50mL の EV Binding Enhancer/Washing Buffer (1×) を流す。

- ・ 推奨流速は、次のとおりです。
6 mL/min
- ・ エアがカラム内に入らないように、あらかじめカラムの接合部分をバッファーで満たしてからベリスタポンプと接合させてください。また、バッファー類は全て室温に戻してからご使用下さい。

⑥ カラム精製 - サンプル反応

- (1) ベリスタポンプを用いて④で脱気処理したサンプルを室温で流し、レジンと反応させる。

- ・ 推奨流速は、次のとおりです。
6 mL/min

⑦ カラム精製 - 洗浄 2

- (1) ベリスタポンプを用いて 100 mL の EV Binding Enhancer/Washing Buffer (1×) でカラム内のレジンを洗浄する。

- ・ 推奨流速は、次のとおりです。
6 mL/min

⑧ カラム精製 - 溶出

- (1) カラム内の EV Binding Enhancer/Washing Buffer を 40%以上置換させるため、ベリスタポンプを用いて 2 mL の EV-Stabilizer/Elution Buffer (1×) を流す。
- (2) 回収用チューブをカラムの下に設置する。
- (3) ベリスタポンプを用いて 18 mL の EV-Stabilizer/Elution Buffer (1×) を流し、溶出液を回収する。

- ・ 推奨流速は、次のとおりです。
1 mL/min

⑨ カラム精製 - カラム保存

- (1) ベリスタポンプを用いて 50 mL の EV Binding Enhancer/Washing Buffer (1×) を流す。
- (2) 10 mL の 20%エタノール/Storage Buffer (1×) を流し、カラム内に 20%エタノール/Storage Buffer (1×) が充填された状態にする (2CV分添加が完了したら止める)。
- (3) カラム上部にパラフィルムを巻いて冷蔵 (2-10℃) で保存する。

- ・ 工程(1)は、⑥サンプル反応の流速以下に設定することを推奨します。
- ・ 推奨流速は、次のとおりです。
工程(1) : 6 mL/min 工程(2) : 4.25 mL/min
- ・ カラムは最大 5 回まで再利用可能です。
- ・ パラフィルムは下図の赤枠部分に巻いてください。



赤枠部分に
パラフィルムを巻く

⑩ 溶出液のバッファー交換

(A) ゲル濾過によるバッファー交換

- (1) 置換したいバッファーに対し、1/100 量の EV-stabilizer A を添加する。
- (2) 溶出液（精製 EV）をゲル濾過カラムに乗せる。
- (3) (1)で調製したバッファーを用いてゲル濾過を実施する。
- (4) ゲル濾過したサンプルを回収する。
- (5) 0.22 μm フィルターにより無菌化処理を行う。

- ・ ゲル濾過の方法やバッファーの必要量は使用するゲル濾過カラムのマニュアルを参照してください。
- ・ 推奨ゲル濾過カラム
PD SpinTrap G-25 : Cytiva# 28-9180-04
PD MidiTrap G-25 : Cytiva# 28-9180-08
PD Desalting columns : Cytiva# 17-0851-01
- ・ ゲル濾過では濃縮はできません。
- ・ サイズが大きいゲル濾過カラムを使用する場合、ボイドボリュームにより⑧で回収したサンプルが希釈される場合があります。
- ・ ゲル濾過の効率によっては、EDTA 除去のため複数回ゲル濾過を実施する必要があります。

(B) 限外濾過によるバッファー交換

- (1) 置換したいバッファー（溶出液の 27 倍量）に対し、1/100 量の EV-Stabilizer B を添加する。
- (2) 溶出液（精製 EV）を 100kDa 限外濾過膜に添加する。
- (3) 9 倍量の EV-Stabilizer B 含有バッファー（(1) で用意したもの）を添加し、限外濾過を実施する(遠心目安：5000×g 10-20 分)。
- (4) (3)をさらに 2 回繰り返す（合計 3 回の限外濾過=1,000 倍のバッファー交換）。
- (5) 新しいチューブに限外濾過後のサンプルを回収。
- (6) 0.22μm フィルターにより無菌化処理を行う。

- ・ 必ず PES 素材の限外濾過膜をご使用ください。
推奨限外濾過カラム
VIVASPIN 500, MWCO 100,000, PES : SARTORIUS#VS0141/VS0142
VIVASPIN 6, MWCO 100,000, PES : SARTORIUS#VS0641/VS0642

【トラブルシューティング：カラムにエアが混入した場合】

20%エタノールを下記流速で通液することで、カラムに混入したエアを除去できる場合がございます。ただし、エア混入によりレジンの性能が劣化する可能性がありますのでご注意ください。

(流速) 4.25 mL/min

参考写真：エア－混入前→エア－混入後→エア－除去工程→エア－除去後

