

FUJIFILM**Wako**

Code No. 290-80301 (1 Kit : 0.5 mL Slurry)

For Genetic Research PS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit

[Introduction]

This kit can easily isolate high purity extracellular vesicles (EVs) such as exosomes having phosphatidylserine (PS) on the membrane surface by using PS Affinity method, which use a resin immobilizing PS-binding protein.

This kit uses nonmagnetic resin and captures extracellular vesicles metallic ion-dependently and elute extracellular vesicles in nearly intact state under neutral condition using a chelating agent similarly to MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (Code No. 293-77601) that utilizes magnetic beads.

[Feature]

- Highly pure extracellular vesicles are obtained by PS affinity method.
- Extracellular vesicles are obtained in nearly intact state.
- Purification is possible simply by centrifugation without a magnetic stand.
- An optimal protocol can be set by the amount of a sample (1.2 mL to 40 mL).
- Ultrafiltration concentration of a sample is unnecessary.

[Kit Contents]

This kit includes 5 components.

| | |
|--------------------------------|------------------|
| • 1 Kit : 0.5 mL Slurry | 0.5 mL × 1 tube |
| (1) Exosome Capture Resin | 50 mL × 1 bottle |
| (2) Exosome Basic Buffer (10×) | 10 mL × 1 bottle |
| (3) Binding Enhancer (100×) | 5 mL × 1 bottle |
| (4) Washing Enhancer (100×) | 0.5 mL × 1 tube |

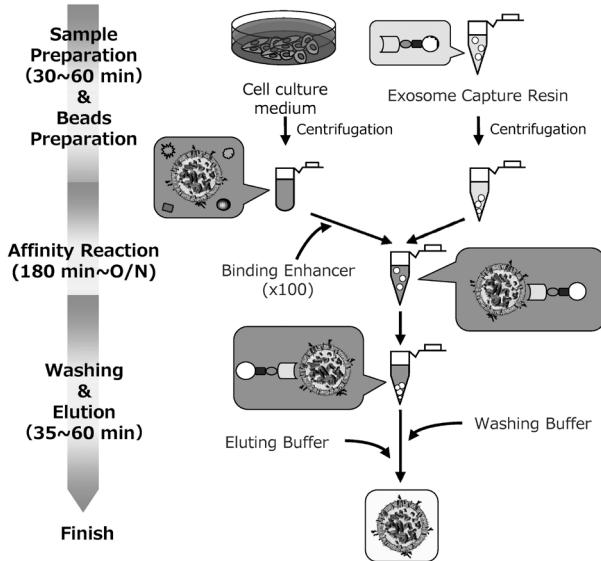
[Storage]

Store at 2-10°C

[Necessary Equipment]

- Centrifuge
 - For preparation of samples : A cooling type at 10,000×g centrifugation force
 - For isolation of exosome : With a swing rotor at 2,000 to 3,000×g centrifugation force
 - (applicable to 5 mL centrifuge tube, 15 mL centrifuge tube or 50 mL centrifuge tube)
 - At 2,000 to 3,000×g centrifugation force (1.5 to 2 mL microtube)
- Tabletop centrifuge
- Vortex mixer
- Rotator

[Outline of Procedure]



[Preparation of sample]

A simple centrifugation shown below is recommended with this kit to obtain each main fraction.

- [1] Use a supernatant obtained by centrifugation at 10,000×g as a sample to isolate Small Extracellular Vesicles (Small EVs) such as exosomes.
- [2] To isolate Large Extracellular Vesicles (Large EVs) such as microvesicles, obtain a supernatant centrifuged at 1,200×g first and, then, centrifuge this at 10,000×g and suspend the obtained precipitate in TBS and then use it as a sample.
- [3] Use the supernatant centrifuged at 1,200×g as the sample to isolate both Small EVs and Large EVs together.

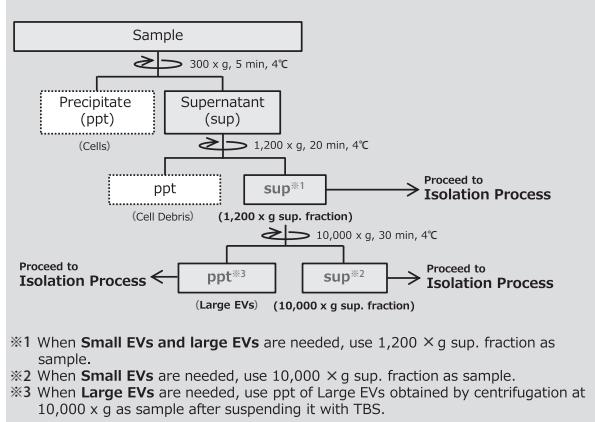
Centrifugation Condition

1. Recover the cell culture medium, centrifuge at 4°C, 300×g, for 5 minutes, and transfer the supernatant to a new tube.
2. Centrifuge the supernatant from step-1 at 4°C, 1,200×g, for 20 minutes, and transfer the supernatant to a new tube (1,200×g supernatant).
3. Centrifuge the supernatant from step-2 at 4°C, 10,000×g, for 30 minutes, and transfer the supernatant to a new tube (10,000×g supernatant).

Note [1] : If a fetal bovine serum (FBS) is added to a medium for cell culture, use a FBS after elimination of extracellular vesicles by ultracentrifugation (example: 18 hours centrifugation at 110,000×g) or commercially available extracellular vesicle-free FBS.

Note [2] : Use fresh cell culture supernatant as a sample.

Flowchart of Sample Preparation



Isolation Process

We recommend the following conditions with **a sample volume equivalent to 80% of the container capacity as ideal to avoid an extra space in the binding reaction container** since extracellular vesicles including exosomes are likely to adsorb to containers.

Table-1 Recommended conditions by a container

| Binding reaction container | Sample volume | Amount of resin (slurry) | Volume of washing buffer after reaction | Volume of elution buffer |
|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|---|
| Remarks | 80% of the binding reaction container | Sample volume \times 1/200 to 1/100 | Sample volume/time | Amount of resin (slurry) \times 2.5 times/time |
| 1.5 mL tube | 1.2 mL | 20 μ L (minimum volume) | 1.2 mL/time \times 3 times | 50 μ L (minimum volume)/time \times 2 times |
| 2 mL tube | 1.6 mL | 20 μ L (minimum volume) | 1.6 mL/time \times 3 times | 50 μ L (minimum volume)/time \times 2 times |
| 5 mL tube | 4.0 mL | 20 μ L ~ 40 μ L | 4 mL/time \times 3 times | 50 μ L ~ 100 μ L/time \times 2 times |
| 15 mL tube | 12 mL | 60 μ L ~ 120 μ L | 12 mL/time \times 3 times | 150 μ L ~ 300 μ L/time \times 2 times |
| 50 mL tube | 40 mL | 200 μ L ~ 400 μ L | 40 mL/time \times 3 times | 0.5 mL ~ 1.0 mL/time \times 2 times |

Preparation of each reagent

• Preparation of washing buffer

Prepare the "washing buffer" of a necessary volume by adding 1/10-volume of Exosome Basic Buffer (10 \times), 1/100-volume of Binding Enhancer (100 \times), and 1/100-volume of Washing Enhancer (100 \times) to purified water.

Note [3] : The washing buffer is also used for washing the resin in the initial process in addition to the volumes in the above table. Prepare the washing buffer of that volume (20 times the amount of resin) as well.

• Preparation of elution buffer

Prepare the "elution buffer" of a necessary volume by adding 1/10-volume of Exosome Basic Buffer (10 \times) and 1/100-volume of Eluting Enhancer (100 \times) to purified water.

Operation

In the isolation of extracellular vesicles, perform centrifugation in each process under the following conditions according to the sample volume.

Table-2 Centrifugation conditions by a container

| Container | Recommended Sample volume | Centrifugation condition |
|-------------|---------------------------|--|
| 1.5 mL tube | 1.2 mL | $3,000 \times g$, 1 minute, room temperature (※) |
| 2 mL tube | 1.6 mL | $3,000 \times g$, 1 minute, room temperature (※) |
| 5 mL tube | 4.0 mL | $2,000 - 3,000 \times g$, 5 minutes, room temperature, swing rotor |
| 15 mL tube | 12 mL | $2,000 - 3,000 \times g$, 10 minutes, room temperature, swing rotor |
| 50 mL tube | 40 mL | $2,000 - 3,000 \times g$, 10 minutes, room temperature, swing rotor |

(※) Tabletop centrifuge can be used alternatively.

1. Add the washing buffer of 20 times the volume of a resin slurry in a tube (example : 400 μ L of the washing buffer to 20 μ L of the resin slurry), add Exosome Capture Resin (resin slurry homogenized by vortex immediately before), vortex lightly and centrifuge (see Table-2 above for the centrifugation condition).

2. Remove the supernatant as much as possible (aspirate loosely and, then, remove the supernatant using a pipet of a small volume, taking care not to aspirate the resin as much as possible).
3. Add the sample to the tube, add 1/100-volume of the Binding Enhancer (100 \times), and agitate using a rotator for binding of the resin and extracellular vesicles in the sample (refrigerated, 3 hours to overnight).
4. Centrifuge the sample-resin mixture after binding to precipitate the resin (see Table-2 above for centrifugation condition).
5. Remove the supernatant as much as possible (aspirate loosely and, then, remove the supernatant using a pipet of a small volume, taking care not to aspirate the resin as much as possible).

Note [4] : When further recovery of remaining extracellular vesicles is needed, please store the used supernatant.

6. Add the washing buffer and vortex lightly (see Table-1 above for the volume of the washing buffer to be added), and centrifuge to precipitate the resin (see Table-2 above for centrifugation condition).
7. Remove the supernatant.
8. Repeat steps (6 and 7) once.
9. Add the washing buffer and vortex lightly (see Table-1 above for the volume of the washing buffer to be added), and centrifuge to precipitate the resin (see Table-2 above for centrifugation condition).

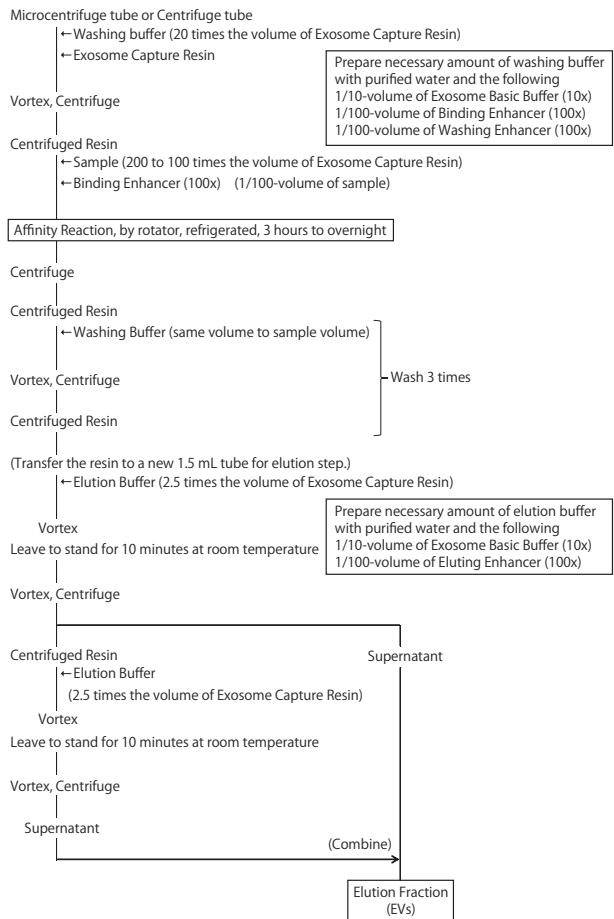
Note [5] : When a binding reaction container other than 1.5 mL tube is used, transfer the resin to a new 1.5 mL tube for elution step. Leave the centrifuged supernatant of about the same amount as the resin and suspend them, and transfer it to a new 1.5 mL tube, then centrifuge for 1 min to precipitate the resin.

10. Remove the supernatant as much as possible (aspirate loosely and, then, remove the supernatant using a pipet of a small volume, taking care not to aspirate the resin as much as possible).
11. Add the "elution buffer" to the resin after washing and vortex (see Table-1 above for the volume of the elution buffer to be added), and leave to stand for 10 minutes at room temperature.
12. Vortex again after 10 minutes, centrifuge at $3,000 \times g$ for 1 minute at room temperature (tabletop centrifuge can be used alternatively), and transfer the supernatant to a new 1.5 mL or 2 mL tube, taking care not to aspirate the resin as much as possible.

13. To the remaining resin add the "elution buffer" again and vortex (see Table-1 above for the volume of the elution buffer to be added), and leave to stand for 10 minutes at room temperature.
 14. Vortex again after 10 minutes, centrifuge at $3,000 \times g$ for 1 minute at room temperature (tabletop centrifuge can be used alternatively), and transfer the supernatant to combine with the supernatant from step 12, taking care not to aspirate the resin as much as possible.
- Note [6] :** Exosome Capture Resin is reusable after eluting EVs (up to 2 times). Therefore, when you need to recover more remaining EVs from samples, please repeat from the step-3 in **【Isolation Process】** to increase the recovered amount. After collecting the eluate, add the washing buffer and transfer the Exosome Capture Resin (resin slurry homogenized by vortex immediately before) to the appropriate reaction container. After removing the washing buffer, add the used sample stored in Step-5 and start with Step-3. In this case, it is unnecessary to add 1/100-volume of the Binding Enhancer ($100\times$) again. In addition, this kit contains reagents necessary for reuse twice.
15. As necessary, filter out with a $0.2\text{ }\mu\text{m}$ filter to remove the resin (particle size : about $34\text{ }\mu\text{m}$) completely, or for bacteria removal (centrifugal filtration filter is preferable).

Recycling of Exosome Capture Resin after eluting of extracellular vesicles
Used Exosome Capture Resin can be recycled for "Repeated extraction of extracellular vesicles from the same sample (refer to note [6])" and "Purification of extracellular vesicles from sample of the same lot". When you need to purify extracellular vesicles from sample of the same lot, prepare sample first and start with the step-1 in **【Isolation Process】**. Up to the second reuse, extracellular vesicles can be recovered almost equally. In the third to fourth reuse, it is confirmed that the amount of extracellular vesicles in flow-through increases and the recovery performance decays. When you need to store the used Exosome Capture Resin, please add the Washing buffer in the kit or $1\times$ TBS containing 0.05 w/v% sodium azide, and suspend it. After suspension, keep it at $2\text{-}10^\circ\text{C}$. Please use it as soon as possible.

【Flowchart of Isolation Process】



| Binding reaction container | Recommended Sample volume | Amount of resin (slurry) | Volume of washing buffer after reaction | Volume of elution buffer |
|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| Remarks | 80% of the binding reaction container | Sample volume \times 1/200 to 1/100 | Sample volume/time | Amount of resin (slurry) \times 2.5 times/time |
| 1.5 mL tube | 1.2 mL | 20 μL (minimum) | 1.2 mL/time \times 3 times | 50 μL (minimum)/time \times 2 times |
| 2 mL tube | 1.6 mL | 20 μL (minimum) | 1.6 mL/time \times 3 times | 50 μL (minimum)/time \times 2 times |
| 5 mL tube | 4.0 mL | 20 μL ~ 40 μL | 4 mL/time \times 3 times | 50 μL ~ 100 μL /time \times 2 times |
| 15 mL tube | 12 mL | 60 μL ~ 120 μL | 12 mL/time \times 3 times | 150 μL ~ 300 μL /time \times 2 times |
| 50 mL tube | 40 mL | 200 μL ~ 400 μL | 40 mL/time \times 3 times | 0.5 mL ~ 1.0 mL/time \times 2 times |

| Container | Recommended Sample volume | Centrifugation condition |
|-------------|---------------------------|--|
| 1.5 mL tube | 1.2 mL | 3,000 × g, 1 minute, room temperature (※) |
| 2 mL tube | 1.6 mL | 3,000 × g, 1 minute, room temperature (※) |
| 5 mL tube | 4.0 mL | 2,000 - 3,000 × g, 5 minutes, room temperature, swing rotor |
| 15 mL tube | 12 mL | 2,000 - 3,000 × g, 10 minutes, room temperature, swing rotor |
| 50 mL tube | 40 mL | 2,000 - 3,000 × g, 10 minutes, room temperature, swing rotor |

(※) Tabletop centrifuge can be used alternatively.

[Related Products]

| Code No. | Description | Size |
|-----------|--|------------------|
| 299-77603 | MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS | 2 purifications |
| 293-77601 | | 10 purifications |
| 297-79201 | PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD) | 96 reactions |
| 297-79701 | PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit | 300 reactions |
| 016-27061 | Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13) | 20 μL |
| 012-27063 | Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13) | 100 μL |
| 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) S. Osawa, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **488** (1), 232-238 (2017).
- 3) S. Nagashima, *et al.*, *J. Virol.*, **91** (22), Published Online (2017).
- 4) T. Yoshida, *et al.*, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, Published Online (2017).
- 5) S. Saito, *et al.*, *Sci Rep* **8**, 3997 (2018).

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://fwk.fujifilm.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 : +49-2131-311-0 Facsimile : +49-2131-311100 http://www.wako-chemicals.de |
|--|--|

コード No. 290-80301 (1 Kit : 0.5 mL Slurry)

遺伝子研究用 PS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit

【はじめに】

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を固相化したレジン担体を用いた PS アフィニティ法により、PS を膜表面に有するエクソソームなどの細胞外小胞を高純度かつ簡便に単離できます。非磁性レジン担体を使ったキットであり、磁気ビーズを利用した MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (コード No. 293-77601) と同様に金属イオン依存的に細胞外小胞を捕捉し、キレート剤により中性条件下でインタクトに近い状態の細胞外小胞を溶出できます。

【特長】

- ・PS アフィニティ法により高純度な細胞外小胞が取得可能
- ・インタクトに近い細胞外小胞を取得可能
- ・マグネットスタンドをお持ちでない方でも遠心操作だけで精製可能
- ・サンプル量別 (1.2mL ~ 40mL) の最適プロトコールを設定
- ・サンプルの限外濾過濃縮が不要

【キット内容】

本キットは5つの構成部材からなります。

| | |
|--------------------------------|-------------|
| ・ 1 Kit : 0.5 mL Slurry | |
| (1) Exosome Capture Resin | 0.5mL × 1 本 |
| (2) Exosome Basic Buffer (10×) | 50mL × 1 本 |
| (3) Binding Enhancer (100×) | 10mL × 1 本 |
| (4) Washing Enhancer (100×) | 5mL × 1 本 |
| (5) Eluting Enhancer (100×) | 0.5mL × 1 本 |

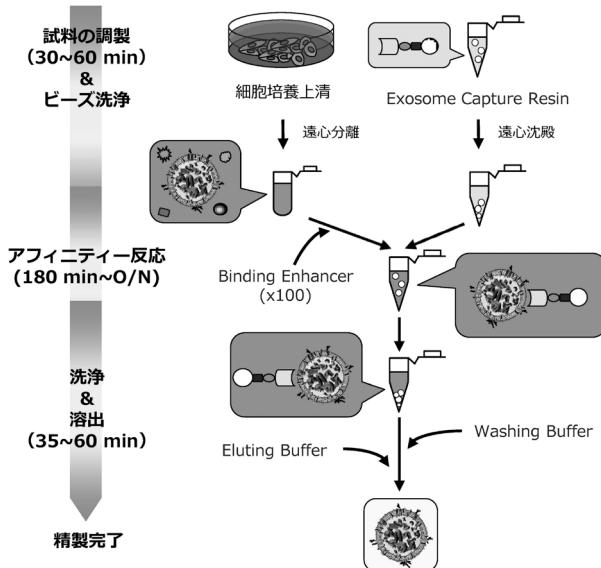
【保存条件】

冷蔵 (2 ~ 10°C)

【必要な装置】

- ・遠心分離機
- 試料の調製用途：冷却式で遠心力 $10,000 \times g$ が可能
- エクソソーム単離用途：遠心力 $2,000 \sim 3,000 \times g$ が可能、スイングローター付
(検体量に応じて 5mL 遠沈管、15mL 遠沈管、50mL 遠沈管に適用可能)
- 遠心力 $2,000 \sim 3,000 \times g$ が可能 (1.5 ~ 2mL マイクロチューブ)
- ・簡易卓上型遠心機
- ・ボルテックスミキサー
- ・回転式攪拌機 (ローター)

【操作概要】



【試料の調製】

本キットでは、各々の主要な画分を得るために以下の簡便な遠心分離方法を推奨しています。

- ①エクソソームを始めとする粒子径が小さい細胞外小胞 (small EVs) を単離対象とする場合は、 $10,000 \times g$ で遠心分離した上清を試料としてください。
- ②マイクロベジクルを含む粒子径が大きい細胞外小胞 (Large EVs) を単離対象とする場合は、まず $1,200 \times g$ で遠心分離した上清を取得し、それを $10,000 \times g$ で遠心分離して得られる沈殿を TBS に懸濁して試料としてください。
- ③small EVs、Large EVs の両方を一緒に単離対象とする場合は、 $1,200 \times g$ で遠心分離した上清を試料としてください。

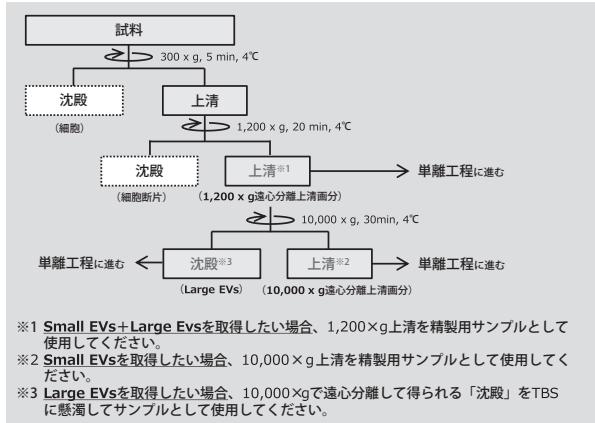
遠心分離条件

1. 細胞培養液を回収し、 4°C 、 $300 \times g$ で 5 分間遠心分離して上清を新しいチューブに移す。
2. Step-1 の上清を 4°C 、 $1,200 \times g$ で 20 分間遠心分離して上清を新しいチューブに移す ($1,200 \times g$ 遠心分離上清画分)。
3. Step-2 の上清を 4°C 、 $10,000 \times g$ で 30 分間遠心分離して上清を新しいチューブに移す ($10,000 \times g$ 遠心分離上清画分)。

注意①：細胞培養の際に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： $110,000 \times g$ で 18 時間遠心) 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 をご使用してください。

注意②：細胞培養上清は新鮮なものを試料としてください。

〔サンプルの準備フロー〕



【単離工程】

エクソソームを始めとする細胞外小胞は容器などへの吸着が起こりやすいため、結合反応容器中に余分な空間をつくるないようにする必要があります。試料液量は容器容量の8割が理想であり、下記条件を推奨しています。

表1 容器毎の推奨条件

| 結合反応容器 | 試料液量 | レジン量 (懸濁液) | 反応後の 洗浄液量 | 溶出液量 |
|------------|-----------|----------------------|-------------------|----------------------------|
| 備考 | 結合反応容器の8割 | 試料液量 × 1/200 ~ 1/100 | 試料液量 / 回 | レジン量 × 25倍 / 回 |
| 1.5mL チューブ | 1.2mL | 20 μL (最低量) | 1.2mL / 回 × 3回 | 50 μL (最低量) 回 × 2回 |
| 2mL チューブ | 1.6 mL | 20 μL (最低量) | 1.6mL / 回 × 3回 | 50 μL (最低量) 回 × 2回 |
| 5mL 遠沈管 | 4.0mL | 20 μL ~ 40 μL | 4mL / 回 × 3回 | 50 μL ~ 100 μL/ 回 × 2回 |
| 15mL 遠沈管 | 12mL | 60 μL ~ 120 μL | 12mL / 回 × 3回 | 150 μL ~ 300 μL/ 回 × 2回 |
| 50mL 遠沈管 | 40mL | 200 μL ~ 400 μL | 40mL / 回 × 3回 | 0.5 mL ~ 1.0 mL/ 回 × 2回 |

各試薬の調製

・洗浄液の調製

精製水に1/10量のExosome Basic Buffer (10×)、1/100量のBinding Enhancer (100×)、1/100量のWashing Enhancer (100×)を添加して、上記表1を参考にして必要な液量の「洗浄液」を調製してください。

注意④：洗浄液は上記表の液量に加えて、最初の工程でレジンの洗浄にも使用しますので、その分量（レジン量 × 20倍）の洗浄液も調製してください。

・溶出液の調製

精製水に1/10量のExosome Basic Buffer (10×)、1/100量のEluting Enhancer (100×)を添加して必要な液量の「溶出液」を調製してください。

操作

細胞外小胞の単離操作における各工程の遠心条件は試料液量に従い下記条件で行ってください。

表2 容器毎の遠心条件

| 容器 | 推奨試料液量 | 遠心条件 |
|------------|--------|------------------------------------|
| 1.5mL チューブ | 1.2mL | 3,000 × g、1分間、室温（※） |
| 2mL チューブ | 1.6mL | 3,000 × g、1分間、室温（※） |
| 5mL チューブ | 4.0mL | 2,000 ~ 3,000 × g、5分間、室温、スイングローター |
| 15mL チューブ | 12mL | 2,000 ~ 3,000 × g、10分間、室温、スイングローター |
| 50mL チューブ | 40mL | 2,000 ~ 3,000 × g、10分間、室温、スイングローター |

（※）簡易卓上型遠心機でも代用可能

- チューブにレジン懸濁液の20倍量の洗浄液を添加し（例えば、レジン懸濁液20 μLに対しても400 μL洗浄液）、そこへExosome Capture Resin（直前にボルテックス混合して均一化したレジン懸濁液）を添加して、軽くボルテックスしてから遠心する（遠心条件は上記表2参照）。
 - 遠心上清をできるだけ取り除く（大まかに吸い取った後、容量の小さなビペットに替えてレジンができるだけ吸い取らないようにしながら遠心上清を取り除くと良い）。
 - 対象とする試料をチューブに添加し、その試料液量の1/100倍量のBinding Enhancer (100×)を添加してからローターで回転攪拌してレジンと試料中の細胞外小胞を結合反応させる（冷蔵、3時間～終夜）。
 - 結合反応を終えた試料・レジン混合液を遠心してレジンを沈殿させる（遠心条件は上記表2参照）。
 - 遠心上清をできるだけ取り除く（大まかに吸い取った後、容量の小さなビペットに替えてレジンができるだけ吸い取らないようにしながら遠心上清を取り除くと良い）。
- 注意④：反応後の試料から未回収の細胞外小胞をさらに回収したい場合は、除去した試料を廃棄せず別の容器に移して保管しておいてください。
- 洗浄液を添加して軽くボルテックスし（洗浄液の添加量は上記表1参照）、遠心してレジンを沈殿させる（遠心条件は上記表2参照）。
 - 遠心上清を取り除く。
 - ステップ（6～7）を1回繰り返す。
 - 洗浄液を添加して軽くボルテックスし（洗浄液の添加量は上記表1参照）、遠心してレジンを沈殿させる（遠心条件は上記表2参照）。
- 注意⑤：1.5mL チューブ以外の結合反応容器を使った場合、溶出反応のために新しい1.5mL チューブにレジンを移してください。レジンと等量程度の遠心上清を残して懸濁し、新しい1.5mL チューブに移した後、1分間遠心しレジンを沈殿させてください。
- 遠心上清をできるだけ取り除く（大まかに吸い取った後、容量の小さなビペットに替えてレジンができるだけ吸い取らないようにしながら遠心上清を取り除くと良い）。
 - 調製した「溶出液」を洗浄後のレジンに添加してボルテックス攪拌し（溶出液の添加量は上記表1参照）、10分間室温で静置する。
 - 反応終了後に再度ボルテックス攪拌してから3,000 × g、1分間、室温で遠心し（簡易卓上型遠心機でも代用可能）、レジンができるだけ吸い取らないようにしながら遠心上清を新しい1.5mLあるいは2mLチューブに移す。
 - 残ったレジンに再び「溶出液」を添加してボルテックス攪拌し（溶出液の添加量は上記表1参照）、10分間室温で静置する。
 - 反応終了後に再度ボルテックス攪拌してから3,000 × g、1分間、室温で遠心し（簡易卓上型遠心機でも代用可能）、レジンができるだけ吸い取らないようにしながら遠心上清をステップ（12）の遠心上清に移して合わせる。
- 注意⑥：細胞外小胞を溶出した後のExosome Capture Resinは再利用（最大2回）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、【単離工程】の操作Step-3からアフィニティー精製を繰り返し

てください。溶出液を回収後、洗浄液を添加して Exosome Capture Resin (直前にボルテックス混合して均一化したレジン懸濁液) を適切な反応容器に移してください。洗浄液を除去後、Step-5 で保管しておいた使用後試料を添加し、Step-3 からはじめます。この際、1/100 倍量の Binding Enhancer (100×) を再度添加する必要はありません。なお、本キットには 2 回再利用するために必要な試薬が含まれています。

15. 必要に応じて、レジン（粒径：約 34 μm）を完全に除くため、あるいは除菌のために 0.2 μm フィルターでろ過を行う（遠心濾過フィルターが好ましい）。

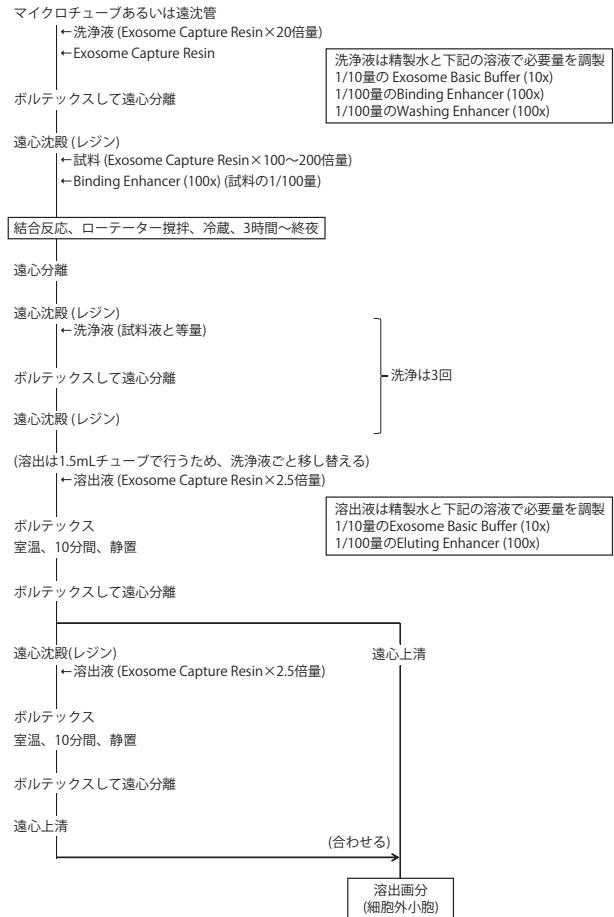
[オプション]

細胞外小胞溶出後の Exosome Capture Resin 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（注意⑥参照）」や「同一ロットの試料から細胞外小胞を精製する場合」に使用済み Exosome Capture Resin を再利用できます。同一ロットの試料から細胞外小胞を単離する場合、サンプルの準備を行い、【単離工程】の操作 Step-1 から進めしてください。再利用 2 回目までは、ほぼ同等に細胞外小胞が回収可能です。再使用 3 回目～4 回目になるとフロースルーが多くなり回収性能が落ちることを確認しています。

使用済み Exosome Capture Resin を保存する場合、調製した洗浄液または自家調製した 0.05 w/v% sodium azide を含む 1×TBS を添加して使用済み Exosome Capture Resin を懸濁し、冷蔵保存してください。可能な限り早くご使用ください。

【単離工程のフローチャート】



| 結合反応容器 | 推奨試料液量 | レジン量 (懸濁液) | 反応後の 洗浄液量 | 溶出液量 |
|------------|-------------|----------------------|-----------------|---------------------------|
| 備 考 | 結合反応容器の 8 割 | 試料液量 × 1/200 ~ 1/100 | 試料液量 / 回 | レジン量 × 2.5 倍 / 回 |
| 1.5mL チューブ | 1.2mL | 20 μL (最低量) | 1.2mL / 回 × 3 回 | 50 μL (最低量) / 回 × 2 回 |
| 2mL チューブ | 1.6mL | 20 μL (最低量) | 1.6mL / 回 × 3 回 | 50 μL (最低量) / 回 × 2 回 |
| 5mL 遠沈管 | 4.0mL | 20 μL ~ 40 μL | 4mL / 回 × 3 回 | 50 μL ~ 100 μL / 回 × 2 回 |
| 15mL 遠沈管 | 12mL | 60 μL ~ 120 μL | 12mL / 回 × 3 回 | 150 μL ~ 300 μL / 回 × 2 回 |
| 50mL 遠沈管 | 40mL | 200 μL ~ 400 μL | 40mL / 回 × 3 回 | 0.5mL ~ 1.0mL / 回 × 2 回 |

| 容 器 | 推奨試料液量 | 遠心条件 |
|---------------|--------|---|
| 1.5mL チューブ | 1.2mL | 3,000 × g、1 分間、室温（※） |
| 2mL チューブ | 1.6mL | 3,000 × g、1 分間、室温（※） |
| 5mL チューブ | 4.0mL | 2,000 ~ 3,000 × g、5 分間、室温、 スイングローター |
| 15 mL チューブ | 12mL | 2,000 ~ 3,000 × g、10 分間、室温、 スイングローター |
| 50mL チューブ | 40mL | 2,000 ~ 3,000 × g、10 分間、室温、 スイングローター |

（※）簡易卓上型遠心機でも代用可能

【関連製品】

| コード No. | 品 名 | 容 量 |
|-----------|--|--------|
| 299-77603 | MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS | 2 回用 |
| 293-77601 | | 10 回用 |
| 297-79201 | PS Capture™ エクソソーム ELISA キット (抗マウス IgG POD) | 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 |
| 016-27061 | 抗 CD63, モノクローナル抗体 (3-13) | 20 μL |
| 012-27063 | 抗 CD63, モノクローナル抗体 (3-13) | 100 μL |
| 290-35591 | マグネットスタンド | 1 台 |
| 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) | 500mL |

【参考文献】

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

製造発売元

富士フィルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

2307KA3