

**FUJIFILM****Wako**Code No. 294-84101 ( 2 purifications)  
290-84103 (10 purifications)For Genetic Research  
**MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2****[Introduction]**

Extracellular Vesicles (EVs) represented by exosomes contain a protein, mRNA, microRNA, DNA, and lipids on the surface or inside. After being secreted from various cells, EVs stably exist in body fluids such as blood, urine, saliva, cerebrospinal fluid, and breast milk. Thus, it is attracting attention as a messenger for cell-to-cell communication and as a biomarker for diseases. As a method for isolating exosomes, an ultracentrifugation method, an affinity method using an antibody against a surface antigen, a precipitation method using a polymer reagent etc. are generally used. However, in all respects such as recovery efficiency, purity, and operability, there was no satisfying way. MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 adopts a novel affinity purification method using magnetic beads and phosphatidylserine (PS)-binding protein (PS affinity method). The PS affinity method can easily isolate exosomes and other EVs with PS on the membrane surface from the cell culture medium and body fluids with high purity and high efficiency. Using the 10,000×g supernatant as a sample, PS affinity can get more highly purified exosomes. Besides, PS affinity enables the elution of intact EVs from magnetic beads with a chelating agent because PS affinity captures EVs in a metal ion-dependent manner. Therefore, purified EVs can be used for various applications such as electron microscopic analysis, nanoparticle tracking analysis, uptake assay, and analysis of constituent molecules (proteins, lipids, nucleic acids, etc.).

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation Products (the Products) are intended for research use only.  
If you use for commercial purpose of the Products, please contact us (ffwk-labchem-tec@fujifilm.com).

**[Feature]**

- Adopted new affinity method (PS affinity method).
- Can obtain EVs with higher yield and higher purity than ultracentrifugation.
- Enables the elution of intact EVs, and can be used for various applications.
- Easy operation with magnetic beads.
- No ultracentrifugation is required.

**[Kit contents]****This kit includes 6 components.****• 2 purifications**

- |                                    |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| (1) Biotin Capture Magnetic Beads  | 120 μL × 1 tube |
| (2) Biotin-labeled Exosome Capture | 20 μL × 1 tube  |

— 1/24 —

(3) Exosome Immobilizing/Washing Buffer (10×)	5 mL × 1 bottle
(4) Exosome Binding Enhancer (500×)	300 μL × 1 tube
(5) Exosome Elution Buffer (10×)	300 μL × 1 tube
(6) Reaction Tubes	4 tubes
<b>• 10 purifications</b>	
(1) Biotin Capture Magnetic Beads	600 μL × 1 tube
(2) Biotin-labeled Exosome Capture	100 μL × 1 tube
(3) Exosome Immobilizing/Washing Buffer (10×)	25 mL × 1 bottle
(4) Exosome Binding Enhancer (500×)	1500 μL × 1 tube
(5) Exosome Elution Buffer (10×)	1500 μL × 1 tube
(6) Reaction Tubes	22 tubes

**[Storage]**

Store at 2-10°C

**[Additional required materials]****Reagents :**

- 1) Distilled Water
- 2) TBS (as necessary)

**Equipment :**

- 1) Microcentrifuge (Max > 10,000×g)
- 2) Vortex mixer
- 3) Tabletop centrifuge
- 4) Magnetic stand
- 5) Rotator or tube mixer
- 6) Micro pipette
- 7) Pipette tip
- 8) Microcentrifuge tube (1.5 mL)
- 9) Centrifuge tube (15 mL) (as necessary)
- 10) Centrifuge tube (50 mL) (as necessary)
- 11) Ultrafiltration unit (Vivaspin6, M.W. cut off : 100 K, Code No. VS0641 or Vivaspin20, M.W. cut off : 100 K, Code No. VS2041) (as necessary)

**[Precaution for use]****1. Equipment**

Please use sterile or DNase and RNase free microcentrifuge tubes and pipette tips. We recommend the use of gloves and a mask to avoid contamination of DNase and RNase.

**2. Reagents**

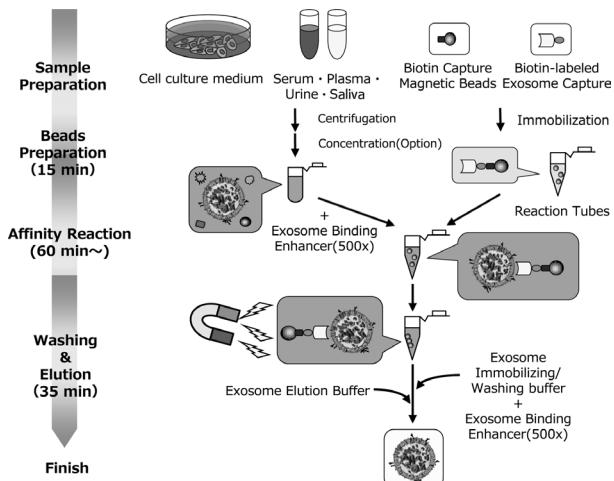
If you analyze the nucleic acid (RNA, DNA) after isolation of exosomes and other EVs, please handle reagents carefully and keep them as sterile as possible. Additionally, if you analyze the mass spectrometry of proteins after isolation of exosomes and other EVs, please be careful of contamination from other proteins.

**3. 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.

— 2/24 —

### [Outline of procedure]



### [Procedure]

#### 1. Preparation of Sample

This is the section to prepare samples. When exosomes and other large EVs are needed, prepare **1,200 × g supernatant** as a sample. Additionally, when highly purified exosomes are needed, prepare **10,000 × g supernatant** as a sample<sup>\*1</sup>. This sample preparation protocol describes the protocol when using cell culture supernatant, serum/plasma sample and urine sample. When using other body fluid samples, refer to the serum/plasma sample protocol and consider the appropriate pretreatment protocol.

<sup>\*1</sup>To remove Large EVs such as apoptotic bodies and microvesicles from a sample, use a centrifugal filter unit (Millipore, Ultrafree-MC, GV 0.22 μm sterile, Code No : UFC30GV0S) after centrifuging the supernatant at 10,000 × g for 30 minutes. The filtrate can be used as a test sample.

#### In the case of cell culture medium

- 1) Culture the cells under the appropriate condition<sup>\*2</sup>.
- 2) Harvest cell culture medium.
- 3) Centrifuge the cell culture medium for 5 minutes at 300 × g 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.... **1,200 × g supernatant**
- 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.... **10,000 × g supernatant**

**(Optional : Concentration of cell culture supernatant by ultrafiltration)**  
If the volume of **1,200 × g supernatant** or **10,000 × g supernatant** is over 1 mL, concentrating the sample to 1 mL or less is available with ultrafiltration unit. The maximum sample volume

as ultrafiltration is 50 mL (50-fold concentration). However, although EVs can be obtained efficiently by concentrating the sample, it may cause physical damage or inactivation of biological activity. Please consider the appropriate processing method according to the purpose of use.

#### Precaution for concentration by ultrafiltration

Since EVs may be adsorbed to the centrifugal ultrafiltration unit, and the recovery amount may be reduced, we recommend adding EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent (Code No : 058-09261) (sold separately) to the sample for preventing loss of EVs. However, this product contains a polymer component, please be careful when using it as a sample for proteomics analysis<sup>\*3</sup>.

<sup>\*2</sup>Please examine appropriate culture conditions depending on cell lines. Since the amount of EVs in the medium is small, please increase the culture scale as much as possible. (Example : 20 mL or more is better) Besides, to ensure that isolated EVs originate from your cells of interest, please use EV-depleted FBS prepared by ultracentrifugation (Example : at 110,000 × g for 18 hours) or commercialized products.

<sup>\*3</sup>When performing proteomics analysis, remove the polymer by appropriate preprocessing such as acetone precipitation.

#### In the case of Serum and Heparin Plasma, Saliva

Please centrifuge serum and heparin plasma used in this section at 1,200 × g beforehand or prepare the processed sample. When exosomes and Large EVs are needed, use 1,200 × g sup. fraction as a sample for purification. If a floating matter is observed in 1,200 × g centrifuged samples, centrifuge again at 1,200 × g and use as a sample for exosomes and Large EVs purification.

- 1) Centrifuge a sample at 10,000 × g for 30 minutes at 4°C to remove the large EVs<sup>\*4</sup>.
- 2) Transfer the supernatant from step 1) into a new tube.... **(10,000 × g supernatant)**

<sup>\*4</sup>When Large EVs are needed, use ppt of Large EVs obtained by centrifugation at 10,000 × g as a sample after suspending it with 500 μL to 1 mL of TBS.

#### In the case of EDTA Plasma and Citrated Plasma

Please centrifuge EDTA plasma and citrated plasma used in this section at 1,200 × g beforehand or prepare the processed sample.

In the case of EDTA and citrated plasma, the anticoagulant contained in the sample inhibits the binding of EVs to Exosome Capture Beads. Therefore, adjust the heparin sodium solution just before the affinity reaction, add it to the centrifuged sample, and proceed to the purification step. Details are described in the section on **EDTA Plasma and Citrated Plasma** in 4. Affinity Reaction.

- 1) Centrifuge a sample at 10,000 × g for 30 minutes at 4°C to remove the large EVs<sup>\*4</sup>.
- 2) Transfer the supernatant from step 1) into a new tube.... **(10,000 × g supernatant)**

### In the case of Urine

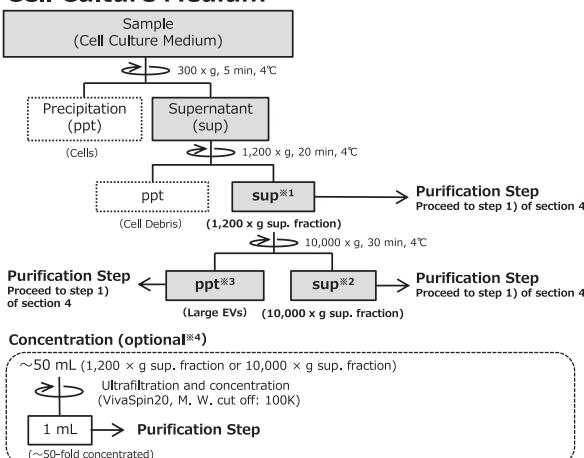
Please add Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ ) to urine used in this section before centrifugation.

Addition of Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ ) after centrifugation may result in the formation of a white precipitate. This precipitate may inhibit the elution of extracellular vesicles from Biotin Capture Magnetic Beads. Therefore, after adding Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ ), perform centrifugation and proceed to the affinity reaction.

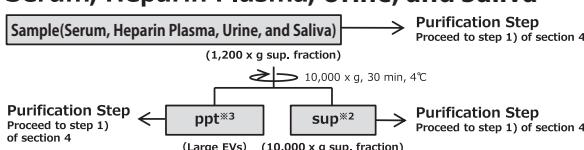
- 1) Add 1/500 volume of Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ ) to the sample. Mix by vortexing.
  - 2) Centrifuge 1) at 1,200 $\times$ g for 20 minutes at 4°C.
  - 3) Transfer the supernatant from step 2) into a new tube....
- 1,200 $\times$ g supernatant of a sample including Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ )**
- 4) Centrifuge 3) at 10,000 $\times$ g for 30 minutes at 4°C.
  - 5) Transfer the supernatant from step 4) into a new tube....
- 10,000 $\times$ g supernatant of A sample including Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ )**
- 6) Proceed **4. Affinity Reaction "In the case of cell culture medium, serum, heparin plasma and urine".**

### [Flowchart of Sample Preparation (Section 1)]

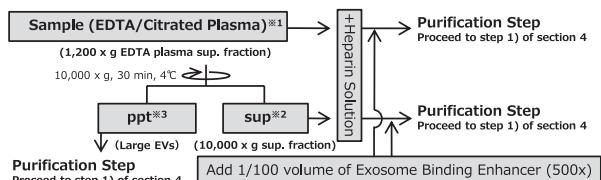
#### Cell Culture Medium



#### Serum, Heparin Plasma, Urine, and Saliva



### EDTA Plasma and Citrated Plasma



※1 When exosomes and large EVs are needed, use 1,200 $\times$ g sup. fraction as sample.

※2 When exosomes are needed, use 10,000 $\times$ g sup. fraction as sample.

※3 When Large EVs are needed, use ppt of Large EVs obtained by centrifugation at 10,000 $\times$ g as sample after suspending it with TBS.

※4 The concentration step is an option when using a large volume (~ 50 mL) of cell culture supernatant as a sample for purification.

### 2. Buffer Preparation

This section is the process of preparing the buffers used in each process. The volume of various buffers required for one sample is 5.0 mL (preparation volume : 5.5 mL) for Exosome Immobilizing/Washing Buffer (1 $\times$ ) and 100  $\mu$ L (preparation volume : 150  $\mu$ L) for Exosome Elution Buffer (1 $\times$ ). When performing the affinity reaction overnight, prepare the 3 mL of Exosome Immobilizing/Washing Buffer (1 $\times$ ) used for washing just before use.

Buffer	Required amount	Preparation volume
Exosome Immobilizing/Washing Buffer (1 $\times$ )	5.0 mL 20 mL → for the section 3 30 mL → for the section 5	5.5 mL
Exosome Elution Buffer(1 $\times$ )	100 $\mu$ L	150 $\mu$ L

1) Add 0.55 mL of Exosome Immobilizing/Washing Buffer (10 $\times$ ) and 4.95 mL of distilled water to a 50 mL centrifuge tube, and add 11  $\mu$ L of Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ ) to prepare the Exosome Immobilizing/Washing buffer (1 $\times$ )<sup>※5</sup>. Mix well.

2) Add 15  $\mu$ L of Exosome Elution Buffer (10 $\times$ ) and 135  $\mu$ L of distilled water to a 1.5 mL microcentrifuge tube (not included in the kit) to prepare the Exosome Elution buffer (1 $\times$ )<sup>※6,※7</sup>. Mix well.

3) Stir the mixtures prepared in step 1) and 2), respectively, and store them separately at room temperature until use.

※5 Make sure to add 1/500 volume of Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ ) to Exosome Immobilizing/Washing Buffer (1 $\times$ ). When not added, the recovery efficiency of exosome is significantly reduced.

※6 By adding EV-Save<sup>TM</sup> Extracellular Vesicle Blocking Reagent (Code No : 058-09261) (sold separately) to the Exosome Elution Buffer used in this process, the adsorption of EVs to the tube can be suppressed and the recovery efficiency can be increased. However, since this product contains a polymer component, please carefully consider its use for proteomics analysis before use.

※7 When using plasma (heparin, EDTA, and citric acid) as a sample, recovery efficiency may be improved by using 2 $\times$  Exosome Elution Buffer. In that case, mix 30  $\mu$ L of Exosome Elution Buffer (10 $\times$ ) and 120  $\mu$ L of distilled water.

### 3. Immobilization of Exosome Capture

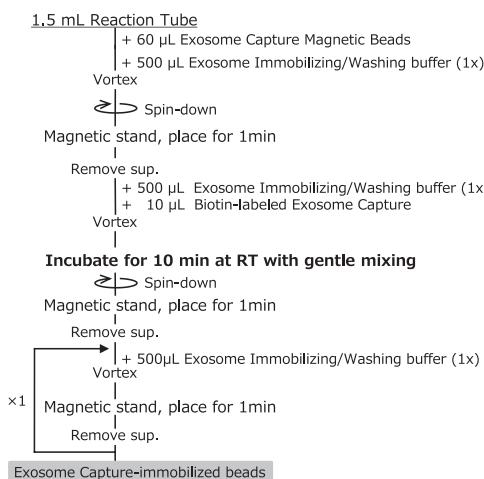
This is the section to immobilize Biotin-labeled Exosome Capture to Biotin Capture Magnetic Beads. Make sure to use the 1.5 mL Reaction Tube (included) in the downstream experiment using magnetic beads<sup>\*8</sup>.

- 1) Transfer 60  $\mu$ L of Biotin Capture Magnetic Beads, which has been well stirred with a vortex mixer, into a new 1.5 mL Reaction Tube.
- 2) Add 500  $\mu$ L of Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1x) into the 1.5 mL Reaction Tube from step 1) and suspend it by vortexing.
- 3) Spin down 2), then places it on the magnetic stand for 1 minute to separate the beads from the solution, and remove the supernatant.
- 4) Add 500  $\mu$ L of Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1x) and 10  $\mu$ L of Biotin-labeled Exosome Capture into the 1.5 mL Reaction Tube from step 3) and mix by vortexing<sup>\*9</sup>.
- 5) Mix for 10 minutes at RT with rotator or tube mixer.
- 6) Spin down 5), then places it on the magnetic stand for 1 minute to separate the beads from the solution, and remove the supernatant.
- 7) Add 500  $\mu$ L of Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1x) into the 1.5 mL Reaction Tube from step 6) and mix by vortexing.
- 8) Spin down 7), then places it on the magnetic stand for 1 minute to separate the beads from the solution, and remove the supernatant.
- 9) Repeat steps7)-8) again...**Exosome Capture-immobilized beads**

\*8 The 1.5 mL Reaction Tube included in the kit can suppress the decrease in recovery rate due to bead adsorption because it uses a material that magnetic beads do not easily adsorb to the tube.

\*9 Depending on the sample, recovery efficiency may be improved by reducing the amount of Biotin-labeled Exosome Capture. When recovery efficiency was low using the standard protocol, reduce the amount of Biotin-labeled Exosome Capture (Example : 10  $\mu$ L  $\rightarrow$  2-5  $\mu$ L).

### [Flowchart of immobilization of Exosome Capture (Section 3)]



— 7/24 —

### 4. Affinity Reaction

This is the affinity reaction section to react the Exosome Capture-immobilized beads with exosomes and other EVs in a sample. The basic protocol use the 1.5 mL Reaction Tube (max volume : 1 mL). When exosomes and other large EVs are needed, use **1,200 × g supernatant** as a sample. Additionally, when highly purified exosomes are needed, use **10,000 × g supernatant** as a sample.

Note : The affinity reaction protocol for EDTA plasma and citrated plasma are different.

#### In the case of cell culture medium, serum, heparin plasma, urine, and saliva

- 1) Transfer a sample (max volume : 1 mL)<sup>\*10</sup> to a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not included in the kit) and add 1/500 volume of Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ ) to the sample. Mix by vortexing...**A sample including Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ )**
- 2) Spin down 1), then transfer it into the 1.5 mL Reaction Tube containing **Exosome Capture-immobilized beads**. Mix by vortexing.
- 3) Mix for 1 hours ~ at RT or 4°C with rotator<sup>\*11</sup>.
- 4) Spin down 3), then places it on the magnetic stand for 1 minute to separate the beads from the solution, and remove the supernatant<sup>\*12</sup>...**EVs-binding beads**

#### In the case of EDTA/citrated plasma

- 1) Dissolve 10,000 U of sodium heparin (Code No : 085-00134) with distilled water to make 1,000 U/mL heparin sodium solution<sup>\*13</sup>.
- 2) Transfer a sample (max volume : 1 mL)<sup>\*10</sup> to a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not included in the kit) and add 1/200 volume of heparin sodium solution to the sample. (final conc. : 5 U/mL)
- 3) Add 1/100 volume of Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ ) to 2) and mix by vortexing...**A sample including Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ )**
- 4) Spin down 3), then transfer it into the 1.5 mL Reaction Tube containing **Exosome Capture-immobilized beads**. Mix by vortexing.
- 5) Mix for 1 hours ~ at RT or 4°C with rotator<sup>\*11</sup>.
- 6) Spin down 5), then places it on the magnetic stand for 1 minute to separate the beads from the solution, and remove the supernatant<sup>\*12</sup>...**EVs-binding beads**
- \*10 When the sample volume is less than 0.5 mL, add TBS to scale up the sample volume to 0.5 mL or more to obtain the better mixture of the Exosome Capture-immobilized beads with a sample. (Example : 100-200  $\mu$ L  $\rightarrow$  500  $\mu$ L)
- \*11 Appropriate reaction time varies depending on the sample and sample volume. For obtaining a sufficient recovery amount, extend the reaction time as appropriate. Regarding the temperature, select either RT or 4°C depending on the purpose of use of the purified exosome.
- \*12 When further recovery of remaining EVs is needed, please store the removed supernatant in another tube.
- \*13 The maximum usage per kit (for 10 purification) is 100  $\mu$ L. After preparation, please store at 4°C.

— 8/24 —

## 5. Washing of EVs-binding beads

This is the washing section of EVs-binding beads.

**Note :** Make sure to add Exosome Binding Enhancer (500×) to Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1×).

- Add 1 mL of Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1×) into the 1.5 mL Reaction Tube containing **EVs-binding beads** and mix by vortexing.

### In the case of EDTA/citratated plasma

After adding 1/200 volume of heparin sodium solution to 1 mL of Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1×) only at the first washing (final conc. : 5 U/mL), suspend with a vortex mixer.

- Spin down 1), then places it on the magnetic stand for 1 minute to separate the beads from the solution, and remove the supernatant.
- Add 1 mL of Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1×) and mix by vortexing.
- Spin down 3), then places it on the magnetic stand for 1 minute to separate the beads from the solution, and remove the supernatant.
- Repeat steps 3)-4) one more time.

- Spin down again the 1.5 mL Reaction Tube from step 6), then places it on the magnetic stand for 1 minute to separate the beads from the solution, and remove the supernatant completely<sup>\*14</sup>...**Washed EVs-binding beads**

※14 Please remove Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1×) in the tube completely, because the remaining buffer causes a reduction of elution efficiency of captured exosomes and other EVs.

## 6. Elution of Extracellular Vesicles

This section is the elution process of EVs from Washed EVs-binding beads.

- Add 50 μL of Exosome Elution Buffer (1×) into the 1.5 mL Reaction Tube containing **Washed EVs-binding beads** and mix by vortexing, then spin down<sup>\*15, \*16, \*17</sup>.

- Places 1) on the magnetic stand for 1 minute to separate the beads from the solution, and transfer the supernatant into a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not included in the kit).

- Add 50 μL of Exosome Elution Buffer (1×) into the 1.5 mL Reaction Tube from step 2) again, and mix by vortexing, then spin down<sup>\*15, \*16, \*17</sup>.

- Places 3) on the magnetic stand for 1 minute to separate the beads from the solution, and transfer the supernatant into the 1.5 mL microcentrifuge tube from step 2) to pool together<sup>\*18, \*19</sup>. (Total : 100 μL)

※15 If the magnetic beads aggregate and can not be uniformly suspended with only a vortex mixer, suspend the beads evenly while applying tapping or pipetting operation. Please avoid excessive suspension using a tube mixer.

※16 By adding 25 μL of Exosome Elution Buffer (1×), you can obtain a more concentrated sample.

※17 When using plasma (heparin, EDTA, and citric acid) as a sample, recovery efficiency may be improved by using 2 × Exosome Elution Buffer.

※18 Exosome Capture-immobilized beads are reusable after eluting EVs (up to 4 times). Therefore, when you need to recover more remaining EVs from samples, please repeat the section 4-6 to increase the recovered amount. After recovering the eluate, please add the stored supernatant of section 4 (refer to ※12) into the 1.5 mL Reaction Tube containing Exosome Capture-immobilized beads from step 4) of section 6 and repeat from the section 4-3) to the section 6-4) as necessary. When using EDTA/Citratated plasma, repeat from the section 4-5) to the section 6-4). This kit contains the required reagents necessary for reuse up to 4 times.

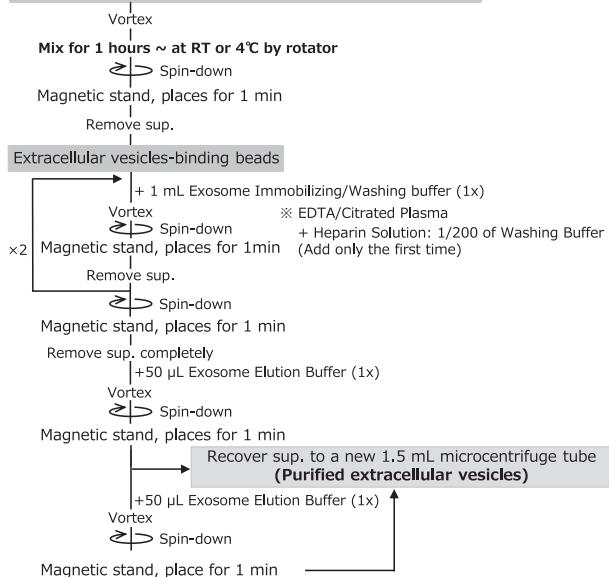
※19 There is a possibility that the pooled eluate have a small amount of magnetic beads. When EVs are analyzed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) or electron microscopic analysis, filter pooled eluate with 0.45 μm pore size filter unit before analysis as necessary. (Example : Ultrafree MC 0.45 μm, Code No. UFC30HV25, Millipore)

## [Flowchart of Affinity Purification (Section4-6)]

### 1.5 mL microcentrifuge tube (not included in the kit)

Cell Culture Medium, Serum, Heparin Plasma, Saliva
+ 1 mL 1,200×g sup. fraction or 10,000×g sup. fraction
+ Exosome Binding Enhancer (500×): 1/500 of sample
Urine
+ Exosome Binding Enhancer (500×): 1/500 of sample
+ 1 mL 1,200×g sup. fraction or 10,000×g sup. fraction
EDTA/Citratated Plasma
+ 1 mL 1,200×g sup. fraction or 10,000×g sup. fraction
+ Heparin Solution: 1/200 of sample
+ Exosome Binding Enhancer (500×): 1/100 of sample

### Exosome Capture-immobilized beads / 1.5 mL Reaction Tube



**[Optional]**

**1. RNA extraction from Purified EVs**

When extracting RNA from eluted EVs, add 100  $\mu$ L of Exosome Elution Buffer (1 $\times$ ) to pooled eluate to prepare 200  $\mu$ L of sample in total. Then, extract RNA from EVs with microRNA Extractor® Kit for Purified EV (Code No : 294-84601) in accordance with the instruction manual.

**2. Recycling of Exosome Capture-immobilized beads**

Used Exosome Capture-immobilized beads can be recycled for "A. Repeated extraction of the remaining EVs from the same sample (refer to  $\Rightarrow$ 12)" and "B. Purification of EVs from the same lot of culture supernatant sample and body fluid sample." Recycling is up to 4 times. When purifying EVs from the same lot of sample, prepare samples first and proceed to section 4-1) of the affinity reaction.

When storing used Exosome Capture-immobilized beads, add 1  $\times$  TBS containing 0.05 w/v% of sodium azide to the Reaction Tube containing the used Exosome Capture-immobilized beads. After suspending it, store at 4°C. We recommend using Exosome Capture immobilized-beads as soon as possible.

**[Related Products]**

Code No.	Description	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	2 purifications
293-77601	PS	10 purifications
290-80301	PS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit	1 Kit (0.5 mL Slurry)
297-79701	PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit	300 reactions
290-83601	CD63-Capture Human Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)	96 reactions
296-83701	CD9-Capture Human Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)	96 reactions
292-83801	CD81-Capture Human Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)	96 reactions
014-27763	Anti CD9, Monoclonal Antibody (1K)	100 $\mu$ L
019-28173	Anti CD9, Rat Monoclonal Antibody (77B)	100 $\mu$ L
017-28211	Anti CD9, Rat Monoclonal Antibody (77B), Biotin-conjugated	50 $\mu$ L
019-27953	Anti CD9, Rat Monoclonal Antibody (30B), Biotin Conjugated	100 $\mu$ L
012-27063	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13)	100 $\mu$ L
014-27643	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Fluorescein Conjugated	100 tests

Code No.	Description	Size
017-27753	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Red Fluorochrome (635) Conjugated	100 tests
019-27713	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Biotin Conjugated	100 $\mu$ L
011-27773	Anti CD81, Monoclonal Antibody (17B1)	100 $\mu$ L
010-28223	Anti CD81, Rat Monoclonal Antibody (9B)	100 $\mu$ L
011-28111	Anti CD81, Rat Monoclonal Antibody (9B), Biotin-conjugated	50 $\mu$ L
052-09301	Exosomes, from COLO201 cells, purified	50 $\mu$ L
058-09261	EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent	1 mL
290-35591	Magnet Stand	1 each
295-71701	microRNA Extractor® SP Kit	50 reactions
085-00134	Heparin Sodium	10,000 U
317-90175	10 $\times$ TBS Buffer (pH 7.4)	500 mL

**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>

Group Companies



Distributors



コードNo. 294-84101 (2回用)  
290-84103 (10回用)

遺伝子研究用  
**MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2**

【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。エクソソームの単離方法として、超遠心分離法、表面抗原に対する抗体を用いたアフィニティ法、ポリマー試薬による沈殿法などが一般的に用いられていますが、回収効率、純度、操作性などすべての点で満足できる方法はありませんでした。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と磁気ビーズを利用して新規アフィニティ法 (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や他の細胞外小胞を高純度かつ高効率で簡便に単離することができます。また、10,000×g 遠心分離を行った上清をサンプルに用いることで、より高純度にエクソソームを取得することができます。さらに、本キットは金属イオン依存的に細胞外小胞を捕捉するため、キレート剤により中性条件下でインタクトな状態の細胞外小胞を溶出することができ、取得した細胞外小胞を、電子顕微鏡解析、ナノ粒子トラッキング解析、投与実験、構成分子（タンパク質、脂質、核酸など）の解析など様々なアプリケーションに利用することができます。

富士フイルム和光純薬株式会社の製品（以下、本品）をご購入後は、研究用途でご使用ください。本品を営利・商業目的にご使用される場合には、弊社お客様相談室 (ffwk-labchem-tec@fujifilm.com) までお問い合わせください。

【特長】

- 新規アフィニティ法 (PSアフィニティ法) を採用
- 従来の超遠心分離法よりも高収量で高純度な細胞外小胞が取得可能
- インタクトな細胞外小胞が取得でき、様々なアプリケーションに利用可能
- 磁気ビーズによる簡便操作
- 超遠心分離が不要

【キット内容】

本キットは6つの構成部材からなります。

・2回用

- |   |              |
|---|--------------|
| (1) Biotin Capture Magnetic Beads             | 120 μL × 1 本 |
| (2) Biotin-labeled Exosome Capture            | 20 μL × 1 本  |
| (3) Exosome Immobilizing/Washing Buffer (10×) | 5mL × 1 本    |
| (4) Exosome Binding Enhancer (500×)           | 300 μL × 1 本 |
| (5) Exosome Elution Buffer (10×)              | 300 μL × 1 本 |
| (6) Reaction Tubes                            | 4 本          |

・10回用

- |   |               |
|---|---------------|
| (1) Biotin Capture Magnetic Beads             | 600 μL × 1 本  |
| (2) Biotin-labeled Exosome Capture            | 100 μL × 1 本  |
| (3) Exosome Immobilizing/Washing Buffer (10×) | 25mL × 1 本    |
| (4) Exosome Binding Enhancer (500×)           | 1500 μL × 1 本 |
| (5) Exosome Elution Buffer (10×)              | 1500 μL × 1 本 |
| (6) Reaction Tubes                            | 22 本          |

【保存条件】

冷蔵 (2 ~ 10°C)

【キット以外に準備する物】

試薬：

- 1) 精製水
- 2) TBS (必要に応じて)

器具：

- 1) 冷却式遠心分離機 (Max > 10,000 × g)
- 2) ボルテックスミキサー
- 3) 卓上遠心機
- 4) 磁気スタンド
- 5) 回転式攪拌機 (ローター) またはチューブミキサー
- 6)マイクロピペット
- 7) ピペットチップ
- 8) 1.5mL マイクロチューブ
- 9) 15mL 遠沈管 (必要に応じて)
- 10) 50mL 遠沈管 (必要に応じて)
- 11) 遠心式限外濃縮ユニット (Sartorius 社 Vivaspin6 分画分子量 100K, Code No : VS0641 または Vivaspin20 分画分子量 100K, Code No : VS2041) (必要に応じて)

【操作前の注意点】

1. 器具類

マイクロチューブ、ピペットチップなどはオートクレーブ処理または市販の DNase・RNase フリー製品を使用して下さい。また、実験中にはプラスチック手袋およびマスクを着用し、DNase・RNase の混入には細心の注意を払って下さい。

2. 試薬類

エクソソームや他の細胞外小胞を単離後に核酸 (RNA、DNA) の解析を行う場合には、試薬の取扱いには十分注意し、使用する試薬類は可能な限り無菌状態を保つよう心掛けて下さい。また単離後にタンパク質の質量分析を行う場合には、タンパク質の混入に十分注意して下さい。

3. 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下さい。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等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下さい。

**【操作概要】**

サンプル前処理  
ビーズ準備 (15 min)  
アフィニティー反応 (60 min~)  
洗浄 & 溶出 (35 min)  
精製完了

**離上清画分**の容量が1mL以上の場合、遠心式限外濃縮ユニットを用いて、1mL以下まで限外濃縮することができます。濃縮できる最大容量は50mL(50倍濃縮)です。ただし、サンプルを濃縮することで効率よく細胞外小胞を取得することができますが、物理的なダメージや生物活性の失活を招く恐れがありますので、使用目的に応じて適切な処理方法をご検討下さい。

**限外濃縮する場合の注意点**  
細胞外小胞が遠心式限外濃縮ユニットに吸着し、回収量が減少する場合があるため、サンプルに別売のEV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent (Code No: 058-09261)を添加してから、限外濃縮することをお勧めします。ただし、本品はポリマー成分を含むため、プロテオミクス解析用サンプルへのご使用については十分にご注意下さい<sup>※3</sup>。

※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)をご検討下さい。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をご使用下さい。

※3 プロテオミクス解析を行う場合は適切な前処理によりポリマー除去を行ったうえで解析を行って下さい。

**血清・ヘパリン血漿・だ液の場合**  
本工程で使用する血清・ヘパリン血漿は、事前に1,200×gの遠心分離処理を実施して下さい。または1,200×g遠心分離処理済みのサンプルをご用意下さい。

エクソソーム+Large EVsを取得したい場合、1,200×g上清を精製用サンプルとして使用しますが、1,200×g遠心分離処理済みサンプル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の遠心分離処理を実施し、エクソソーム+Large EVs精製用サンプルとしてご使用下さい。

1) 10,000×g、4°Cで30分間遠心分離する(Large EVsの分離<sup>※4</sup>)。  
2) 1)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 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500μL～1mLのTBSに懸濁し、サンプルとして使用して下さい。

**EDTA血漿・クエン酸血漿の場合**  
本工程で使用するEDTA血漿およびクエン酸血漿は、事前に1,200×gの遠心分離処理を実施して下さい。または1,200×g遠心分離処理済みのサンプルをご用意下さい。

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Exosome Capture 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下さい。詳細は、4.アフィニティー反応の**EDTA血漿・クエン酸血漿**の項に記載しております。

1) 10,000×g、4°Cで30分間遠心分離する(Large EVsの分離<sup>※4</sup>)。  
2) 1)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)

## 【操作】

### 1. サンプルの準備

本工程はサンプルの前処理ステップです。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)を取得したい場合は下記プロトコルに従い**1,200×g遠心分離上清画分**を調製して下さい。また、エクソソームをより高純度に取得したい場合は、下記プロトコルに従い**10,000×g遠心分離上清画分**を調製して下さい<sup>※1</sup>。

なお、本サンプル準備プロトコルでは細胞培養上清および血清・血漿サンプル、尿サンプルを用いる場合のプロトコルを記載しております。その他の体液サンプルを用いる場合は血清・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下さい。

※1 サンプルからアポトーシス小体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、遠心式フィルターエニット(Millipore社 Ultrafree-MC, GV 0.22 μm 減菌済、Code No: UFC30GV0S)を通した濾過液をサンプルとしてご使用下さい。

### 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<sup>※2</sup>。
- 2) 細胞培養液を回収する。
- 3) 細胞培養液を4°C、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。
- 5) 4°C、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**)。
- 7) 4°C、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)。
- 8) 7)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**)。

### [オプション: 培養上清の限外濃縮]

使用したい**1,200×g遠心分離上清画分**または**10,000×g遠心分離上清画分**。

- 15/24 -

- 16/24 -

## 尿の場合

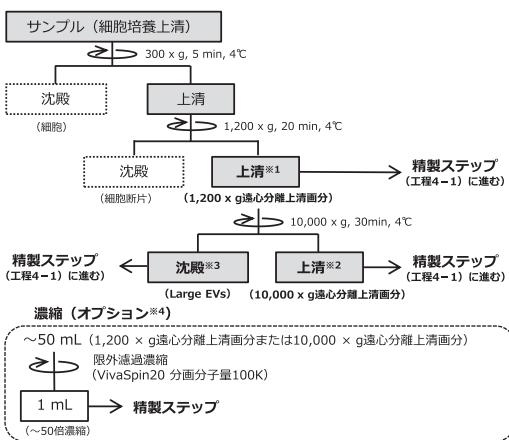
本工程で使用する尿は、遠心分離処理の前に Exosome Binding Enhancer (500×) を添加してください。

遠心分離処理後に Exosome Binding Enhancer (500×) を添加すると、白い沈殿が形成されることがあります。この沈殿は細胞外小胞の Biotin Capture Magnetic Beads からの乖離を阻害する恐れがあります。そのため、Exosome Binding Enhancer (500×) 添加後に遠心分離処理を行い、アフィニティー反応へお進みください。

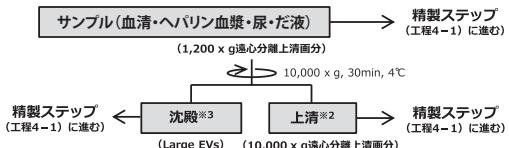
- 1) サンプルに対して 1/500 容量の Exosome Binding Enhancer (500×) を添加し、ボルテックスミキサーで混合する。
- 2) 4°C、1,200 × g で 20 分間遠心分離する。
- 3) 2) の上清を新しいチューブに移す (**Exosome Binding Enhancer (500×) 添加済みサンプル 1,200 × g 遠心分離上清画分**)。
- 4) 4°C、10,000 × g で 30 分間遠心分離する。
- 5) 4) の上清を新しいチューブに移す (**Exosome Binding Enhancer (500×) 添加済みサンプル 10,000 × g 遠心分離上清画分**)。
- 6) 4. アフィニティー反応の細胞培養上清・血清・ヘパリン血漿・尿の場合 2) に進む。

## [サンプルの準備フロー (工程 1)]

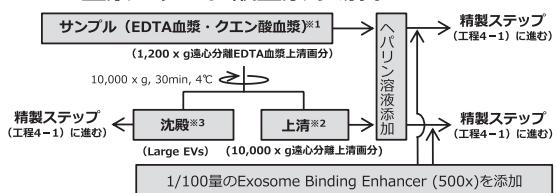
### 細胞培養上清の場合



### 血清・ヘパリン血漿・尿・だ液の場合



## EDTA血漿・クエン酸血漿の場合



\*1 エクソソーム + Large EVs を取得したい場合、1,200 × g 上清を精製用サンプルとして使用してください。

\*2 エクソソームを取得したい場合、10,000 × g 上清を精製用サンプルとして使用してください。

\*3 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 TBS に懸濁してサンプルとして使用してください。

\*4 濃縮ステップは大容量 (~50 mL) の細胞培養上清を精製用サンプルとして使用する場合のオプションです。

## 2. パッファー調製

本工程は各工程で使用するパッファーを調製する工程です。1 サンプル処理するために必要な各種パッファー量は、Exosome Immobilizing/Washing Buffer (1×) が 5.0mL (調液体量 : 5.5mL)、Exosome Elution Buffer (1×) が 100 μL (調液体量 : 150 μL) になります。また、アフィニティー反応をオーバーナイトで行う場合、洗浄に用いる分量 (3mL) については使用直前に用時調製して下さい。

パッファー名	必要量	調液体量
Exosome Immobilizing/Washing Buffer (1×)	5.0mL 2.0mL → 工程 3 で使用 3.0mL → 工程 5 で使用	5.5mL
Exosome Elution Buffer (1×)	100 μL	150 μL

1) 50mL 遠沈管に 0.55mL の Exosome Immobilizing/Washing Buffer (10×) と 4.95mL の精製水を添加し、さらに Exosome Binding Enhancer (500×) を 11 μL 添加して Exosome Immobilizing/Washing buffer (1×) を調製する<sup>\*5</sup>。

2) キット添付品ではない 1.5mL マイクロチューブに、15 μL の Exosome Elution Buffer (10×) と 135 μL の精製水を添加し、Exosome Elution buffer (1×) を調製する<sup>\*6, \*7</sup>。

3) 1) と 2) 共に良く混合し、使用するまで室温で保管する。

\*5 Exosome Immobilizing/Washing Buffer (1×) には必ず Exosome Binding Enhancer (500×) を 1/500 量添加してご使用下さい。未添加の場合、エクソソームの回収効率が著しく低下します。

\*6 本工程で使用する Exosome Elution Buffer に、別売の EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent (Code No : 058-09261) 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。ただし、本品はポリマー成分を含むため、プロテオミクス解析用サンプルへの使用については、十分に検討を行ったうえでご使用下さい。

\*7 血漿 (ヘパリン、EDTA、クエン酸) をサンプルとして用いる場合は、2×の Exosome Elution Buffer を用いることで回収効率が向上する場合があります。その場合は、30 μL の Exosome Elution Buffer (10×) と 120 μL の精製水を添加・混合して調製して下さい。

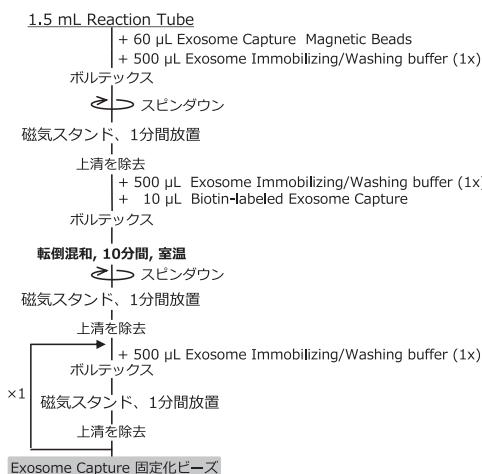
## 3. Exosome Capture の固定化

本工程は Biotin-labeled Exosome Capture を Biotin Capture Magnetic Beads に固定化する工程です。本工程以降の磁気ビー

#### ズ使用操作では必ずキット添付の 1.5mL Reaction Tube をご使用下さい<sup>※8</sup>。

- 1) ボルテックスミキサーでよく攪拌させた Biotin Capture Magnetic Beads 60  $\mu$ L を 1.5mL Reaction Tube に移す。
  - 2) Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1 $\times$ ) 500  $\mu$ L を、1) の 1.5mL Reaction Tube に添加し、ボルテックスミキサーで懸濁する。
  - 3) 1.5mL Reaction Tube 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。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をマイクロピペットで除く。
  - 4) Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1 $\times$ ) 500  $\mu$ L と Biotin-labeled Exosome Capture 10  $\mu$ L を、3) の 1.5mL Reaction Tube に添加し、磁気スタンドから取り外してボルテックスミキサーで懸濁する<sup>※9</sup>。
  - 5) 室温でローター等により転倒混和しながら 10 分間反応させる。
  - 6) 1.5mL Reaction Tube 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。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をマイクロピペットで除く。
  - 7) Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1 $\times$ ) 500  $\mu$ L を、6) の 1.5mL Reaction Tube に添加し、ボルテックスミキサーで懸濁する。
  - 8) 1.5mL Reaction Tube 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。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をマイクロピペットで除く。
  - 9) 7)～8) の操作をさらに 1 回繰り返す。…Exosome Capture 固定化ビーズ
- ※8 キット添付の 1.5mL Reaction Tube は磁気ビーズのチューブ壁面への吸着が少ない材質を採用しており、ビーズ吸着による回収率低下を抑えることができます。
- ※9 サンプルによっては通常プロトコルより Biotin-labeled Exosome Capture の固定化量を減少させることで回収効率が向上する場合があります。通常プロトコルで回収効率が低いサンプルについては、Biotin-labeled Exosome Capture の添加量を減らして下さい（例：10  $\mu$ L → 2 ~ 5  $\mu$ L）。

#### [Exosome Capture の固定化フロー（工程 3）]



— 19/24 —

#### 4. アフィニティー反応

本工程は Exosome Capture 固定化ビーズとサンプルを反応させる工程です。1.5mL Reaction Tube を用いた反応系（最大容量 1mL）を基本プロトコルとしています。エクソソームとその他の細胞外小胞（マイクロベジクルなど）を取得したい場合は **1,200 × g** 遠心分離上清画分を、エクソソームをより高純度に取得したい場合は **10,000 × g** 遠心分離上清画分をサンプルとしてご使用下さい。また、EDTA 血漿・クエン酸血漿の反応プロトコルは異なるため、ご注意下さい。

#### 細胞培養上清・血清・ヘパリン血漿・尿・だ液の場合

- 1) サンプル（最大容量 1mL）<sup>※10</sup> をキット添付品ではない 1.5mL マイクロチューブに移し、サンプルに対して 1/500 容量の Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ ) を添加し、ボルテックスミキサーで混合する。…Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ ) 添加済みサンプル
- 2) Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ ) 添加済みサンプルを卓上遠心機でスピンドウンした後、サンプルを Exosome Capture 固定化ビーズの入った 1.5mL Reaction Tube に移し、ボルテックスミキサーで混合する。
- 3) 室温（冷蔵）でローター等により転倒混和しながら 1 時間以上反応させる<sup>※11</sup>。
- 4) 1.5mL Reaction Tube 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。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をマイクロピペットで除く<sup>※12</sup>。…細胞外小胞結合ビーズ

#### EDTA 血漿・クエン酸血漿の場合

- 1) ヘパリンナトリウム（Code No : 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<sup>※13</sup>。
  - 2) サンプル（最大容量 1mL）<sup>※10</sup> をキット添付品ではない 1.5mL マイクロチューブに移し、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）
  - 3) 2) に 1/100 容量の Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ ) を添加し、ボルテックスミキサーで混合する。…Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ ) 添加済みサンプル
  - 4) Exosome Binding Enhancer (500 $\times$ ) 添加済みサンプルを卓上遠心機でスピンドウンした後、サンプルを Exosome Capture 固定化ビーズの入った 1.5mL Reaction Tube に移し、ボルテックスミキサーで混合する。
  - 5) 室温（冷蔵）でローター等により転倒混和しながら 1 時間以上反応させる<sup>※11</sup>。
  - 6) 1.5mL Reaction Tube 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。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をマイクロピペットで除く<sup>※12</sup>。…細胞外小胞結合ビーズ
- ※10 サンプル容量が 0.5mL 未満の場合、Exosome Capture 固定化ビーズとサンプルがローターにより上手く攪拌できない場合があるため、必要に応じて TBS を添加してサンプル量を 0.5mL 以上にスケールアップして下さい（例：100 ~ 200  $\mu$ L → 500  $\mu$ L）。
- ※11 使用するサンプルやサンプルボリュームによって適切な反応時間が異なります。十分な回収量を得たい場合は反応時間を見直し延長して下さい。また、温度については、精製エクソソームの使用目的に応じて、室温か冷蔵反応いずれかをお選び下さい。
- ※12 反応後の上清から未回収の細胞外小胞をさらに回収したい

— 20/24 —

場合は、除いた上清を廃棄せず別の容器に移して保管しておいて下さい。  
※13 1 キット（10 回用）当たりの最大使用量は、100 μL です。  
調製後は冷蔵で保管して下さい。

## 5. 細胞外小胞結合ビーズの洗浄

本工程は細胞外小胞結合ビーズを洗浄する工程です。本工程で使用する Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1×) には必ず Exosome Binding Enhancer (500×) を添加してからご使用下さい。

- 1) 細胞外小胞結合ビーズが入った 1.5mL Reaction Tube に Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1×) 1mL を添加し、ボルテックスミキサーで懸濁する。  
EDTA 血漿・クエン酸血漿の場合  
初回洗浄時のみ 1mL の Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1×) に 1/200 容量のヘパリンナトリウム溶液を添加し（終濃度 5U/mL）、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 2) 1.5mL Reaction Tube を卓上遠心機でスピンドラウンした後、専用磁気スタンドにセットし、約 1 分間静置する。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をピペットで除く。
- 3) Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1×) 1mL を添加し、ボルテックスミキサーで懸濁する。
- 4) 1.5mL Reaction Tube を卓上遠心機でスピンドラウンした後、専用磁気スタンドにセットし、約 1 分間静置する。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清をピペットで除く。
- 5) 3)～4) の操作をさらに 1 回繰り返す。
- 6) 1.5mL Reaction Tube を卓上遠心機でスピンドラウンした後、専用磁気スタンドにセットし、約 1 分間静置する。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清残液をマイクロピペットで完全に取り除く<sup>※14</sup>。…**洗浄済み細胞外小胞結合ビーズ**

※14 Exosome Capture Immobilizing/Washing Buffer (1×) が 1.5mL Reaction Tube に残ると溶出効率が低下しますので完全に取り除いて下さい。

## 6. 細胞外小胞の溶出

本工程は、洗浄済み細胞外小胞結合ビーズから細胞外小胞を溶出する工程です。

- 1) 洗浄済み細胞外小胞結合ビーズが入った 1.5mL Reaction Tube に Exosome Elution Buffer (1×) 50 μL を添加し、磁気スタンドから取り外してボルテックスミキサーで懸濁し、卓上遠心機でスピンドラウンする<sup>※15, ※16, ※17</sup>。
- 2) 1.5mL Reaction Tube を専用磁気スタンドにセットし、約 1 分間静置する。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認後、上清をキット添付品ではない新しい 1.5mL マイクロチューブに回収する。
- 3) 2) の磁気ビーズに Exosome Elution Buffer (1×) をさらに 50 μL 添加し、磁気スタンドから取り外してボルテックスミキサーで懸濁し、卓上遠心機でスピンドラウンする<sup>※15, ※16, ※17</sup>。
- 4) 1.5mL Reaction Tube を専用磁気スタンドにセットし、約 1 分間静置する。磁気ビーズが完全にチューブ壁に付着したのを確認した後、上清を 3) の 1.5mL マイクロチューブに回収しプールする<sup>※18, ※19</sup>。

※15 磁気ビーズが凝集してボルテックスミキサーだけでは均一に懸濁されない場合は、タッピングまたはピッティング操作を加えながら、ビーズを均一に懸濁して下さい。また、チューブミキサー等を用いた過度な懸濁は避けて下さい。

※16 添加する Exosome Elution Buffer を 25 μL にすることで、より濃縮させた状態でサンプルを取得することができます。

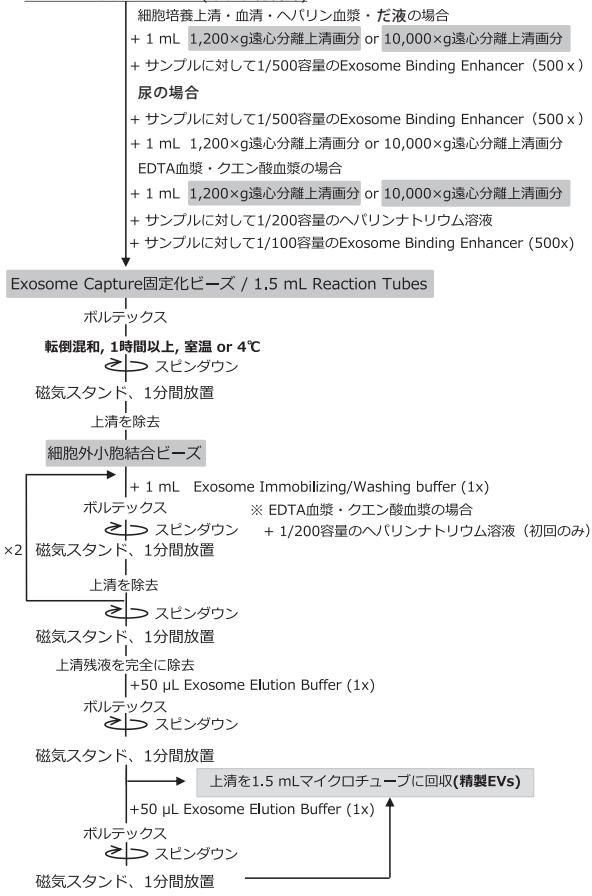
※17 血漿（ヘパリン、EDTA、クエン酸）をサンプルに用いる場合は、2×の Exosome Elution Buffer を用いて同様の溶出工程を行うことで、回収効率が向上する場合があります。

※18 細胞外小胞を溶出した後の Exosome Capture 固定化ビーズは、同一サンプル使用に限り再利用（最大 4 回）することができます。また、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、工程 4～6 のアフィニティー精製を繰り返すことで回収量を増やすことができます。溶出液を回収した後、Exosome Capture 固定化ビーズが入った工程 6-4) の 1.5mL Reaction Tube に工程 4 で別容器に保管しておいた使用後サンプル（※12 参照）を添加し、必要に応じて工程 4-3)～工程 6-4) を繰り返して下さい。EDTA 血漿・クエン酸血漿の場合、工程 4-5)～工程 6-4) を繰り返して下さい。なお、本キットには最大 4 回再利用するために必要な試薬が用意されています。

※19 回収したサンプルには微量の磁気ビーズが混入している可能性があります。細胞外小胞をナノ粒子トラッキング解析や電子顕微鏡解析する際は必要に応じて、フィルター濾過処理（例：Code No : UFC30HV25, メルクミリボラ社）を行った後、その濾液を解析にご使用下さい。

## [アフィニティー精製フロー（工程 4～6）]

### 1.5 mL マイクロチューブ（キット付属）



[オプション]

**1. 精製細胞外小胞からの RNA 抽出**

取得した細胞外小胞から RNA を精製する場合、上記工程 6 で回収した溶出液 100 μL に Exosome Elution Buffer 100 μL を添加し（合計 200 μL サンプル溶液）、精製 EV 用マイクロ RNA エキストラクター®キット (Code No : 294-84601) を用いて、取扱説明書に従って RNA 精製を行って下さい。

**2. Exosome Capture 固定化ビーズの再利用**

「A. 同一サンプルから残存する細胞外小胞を繰り返し抽出する場合（※12 参照）」や「B. 同一ロットの培養上清サンプル、体液サンプルから細胞外小胞を精製する場合」に使用済み Exosome Capture 固定化ビーズを再利用（最大 4 回）できます。

同一ロットのサンプルから細胞外小胞を精製する場合、サンプルの準備を行い、アフィニティ反応【工程 4-1】から進めて下さい。

使用済み Exosome Capture 固定化ビーズを保存する場合は、自家調製した 0.05w/v% sodium azide を含む 1×TBS を用いて使用済み Exosome Capture 固定化ビーズを懸濁し、冷蔵保存して下さい。なお、再利用については可能な限りお早めにご使用下さい。

**【関連製品】**

Code 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™ 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
290-80301	PS Capture™ エクソソームアイソレーションレジンキット	1 キット (0.5mL Slurry)
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
290-83601	CD63-Capture ヒトエクソソーム ELISA キット（ストレプトアビジンHRP）	96 回用
296-83701	CD9-Capture ヒトエクソソーム ELISA キット（ストレプトアビジンHRP）	96 回用
292-83801	CD81-Capture ヒトエクソソーム ELISA キット（ストレプトアビジンHRP）	96 回用
014-27763	抗CD9, モノクローナル抗体 (1K)	100 μL
019-28173	抗CD9, ラットモノクローナル抗体 (77B)	100 μL
017-28211	抗CD9, ラットモノクローナル抗体 (77B), ビオチン結合	50 μL
019-27953	抗CD9, ラットモノクローナル抗体 (30B), ビオチン結合	100 μL
012-27063	抗CD63, モノクローナル抗体 (3-13)	100 μL
014-27643	抗CD63, モノクローナル抗体 (3-13), フルオレセイン結合	100 回用
017-27753	抗CD63, モノクローナル抗体 (3-13), 赤色蛍光色素 (635)結合	100 回用

Code No.	品 名	容 量
019-27713	抗CD63, モノクローナル抗体 (3-13), ビオチン結合	100 μL
011-27773	抗CD81, モノクローナル抗体 (17B1)	100 μL
010-28223	抗CD81, ラットモノクローナル抗体 (9B)	100 μL
011-28111	抗CD81, ラットモノクローナル抗体 (9B), ビオチン結合	50 μL
052-09301	エクソソーム, COLO201 細胞由来, 精製品	50 μL
058-09261	EV-Save™ 細胞外小胞ブロッキング試薬	1mL
290-35591	マグネットスタンド	1 個
295-71701	マイクロRNA エキストラクター® SP キット	50 回用
085-00134	ヘパリンナトリウム	10,000U
317-90175	10×TBS Buffer (pH 7.4)	500mL

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