

EXORPTION® Extracellular vesicles purification kit

製品マニュアル

第3版 2024年4月1日改訂

【はじめに】

細胞外小胞 (Extracellular Vesicle, EV) は、細胞から分泌される脂質二重膜粒子であり、細胞間情報伝達や免疫の制御など様々な生理活性を有していることが知られています。この EV は、分泌細胞由来のタンパク質や核酸、糖鎖等の標識分子を有していることから、診断や治療などの医療分野への応用が強く期待されます。

生体試料や細胞培養上清等から EV を精製する方法として超遠心分離法が広く用いられております。しかし、この方法は専用の設備と長時間の精製工程が必要になることから、より短時間かつ簡便、高純度に EV を精製する方法が求められています。

本製品は生体試料や細胞培養上清中の夾雑物を除去しつつ、EV を短時間かつ簡便に精製することを可能にしました。精製した EV は EV 内外のタンパク質・核酸等の特性の評価、生理活性の確認等、各種分析や実験に利用可能です。

【保存条件】

常温 (15-25°C)

【キット構成】

本キットの構成は以下の(1)~(6)になります。

(1) Purification column	10本
(2) LureCAP (Purification column の下部に装着)	10個
(3) Wash Buffer (×10)	1.7mL 1本
(4) Elution Buffer	1.7mL 1本
(5) 希釈用容器	1本
(6) 製品マニュアル	1部

【キット以外に準備する物】

- ・マイクロピペット
- ・ピペットチップ※
- ・2mL マイクロチューブ※
- ・卓上遠心機
- ・冷却式遠心分離機
- ・ポルテックスミキサー

※ピペットチップ等はタンパク質低吸着グレードの物の使用を推奨します。

【注意事項】

- EV 精製後に核酸の解析を行う場合は、マイクロチューブ、ピペットチップ等はオートクレーブ処理あるいは DNase・RNase フリー製品を使用してください。
- EV の精製操作中に発生した廃液、ピペットチップ、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ください。

【Wash Buffer (×1) の調製】

Wash Buffer (×10) を超純水で希釈することで Wash Buffer (×1) を調製します。1 カラム当たり 1.5mL の Wash Buffer が必要なため、使用するカラム数に合わせて Wash Buffer を用時調製してください。

調製例 (カラム 1 本当たり Wash Buffer (×1) を 1.6mL 調製)

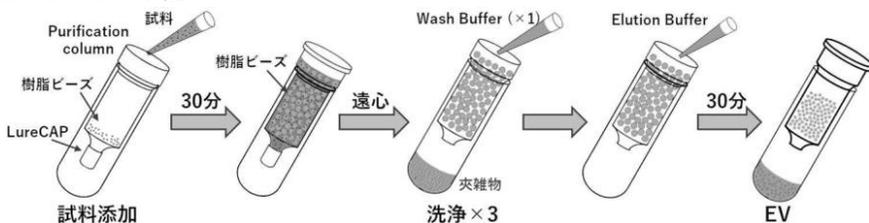
使用カラム数	Wash Buffer (×10)	超純水
1本	0.16 mL	1.44 mL
2本	0.32 mL	2.88 mL
5本	0.80 mL	7.20 mL

【試料の前処理】

スピンカラムで試料を精製する前処理として遠心分離 (2000×g、10分、4°C) により試料中のデブリ等を除去して下さい。その他検体に応じて適切に前処理の実施をお願いします。試料中に不溶物等が多い場合、スピンカラムの目詰まりの可能性や EV 回収量の低下の恐れがあります。

【精製プロトコル】

●スタンダード法



1mL の試料から EV の精製が可能になります。試料量が 1mL 以下の場合には液量が 1mL になるように PBS、生理食塩水等で希釈してからの使用を推奨します。

1) Purification column 上蓋に樹脂ビーズが付着している場合は、タッピングやスピンドアウン等で樹脂ビーズをカラム内部に落とした上で Purification column の下部キャップを取り外し、付属の LureCAP を装着する。

2) Purification column を 2mL マイクロチューブにセットし、上蓋を外してから Purification column に試料 1mL をゆっくり加え、上蓋を被せて 30 分間静置する。

3) LureCAP を取り外し、Purification column を 2mL マイクロチューブにセットする。

4) 卓上遠心機による遠心分離 (1000×g, 30~60 秒, 室温) により 2mL マイクロチューブに回収した未吸着液を除去する。

パルスフロー法を行う場合は 4) の操作後、P1) ~P3) の操作へお進みください。

5) Wash Buffer (×1) を 0.5mL 加え、卓上遠心機による遠心分離 (1000×g, 30~60 秒, 室温) により 2mL マイクロチューブに洗浄液を回収し除去する。

この工程を計 3 回行い、樹脂ビーズを洗浄する。

注) 膨潤した樹脂ビーズはこぼれやすくなっている為、上蓋の取り外しはカラムをセットしたマイクロチューブを手で持って行うことを推奨します。

6) Purification column を新しい 2mL マイクロチューブに移し替え、Purification column に Elution Buffer を 0.1mL 添加する。

7) ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌後、30 分間静置することで吸着した EV を遊離させる。

本製品は研究用です。医療・臨床診断用途での使用はお控えください。

8) 遠心分離 (1000×g, 30~60 秒, 室温) により 2mL マイクロチューブに溶出液を回収する。
注) 樹脂ビーズ中の水分も放出されるため、液量は Elution Buffer 添加量より多くなります。溶出液は高濃度の塩が含まれているため、必要に応じて希釈・脱塩処理を行ってください。

本キットで精製した EV を評価するプロトコルの一例を以下に示します。

ELISA：緩衝塩を含まない希釈液か BSA 溶液で 3 倍以上希釈することを推奨

CD9/CD63 Exosome ELISA Kit (コスモ・バイオ社) の場合、精製液を 0.2% BSA 溶液で 3 倍以上希釈

RNA 抽出：Exosomal RNA Isolation Kit (Norgen 社) を使用する場合、溶出液を直接スピンドラムに添加

●パルスフロー法



パルスフロー法は試料中の EV が低濃度かつ試料量が多い場合に適応できる精製方法です。最大 4.6mL までの試料から EV の精製が可能です。

P1) 4) の操作後、試料 0.4mL を添加し、10 分間静置する。

P2) 遠心分離 (1000×g, 30~60 秒, 室温) により 2mL マイクロチューブに回収した未吸着液を除去する。

P3) P1) ~P2) の操作を複数回繰り返す (最大 9 回)。

P3) の操作の後、5) の操作へお進みください。

お問い合わせ先：三洋化成工業株式会社 バイオ・メディカル事業本部

〒605-0995 京都市東山区一橋野本町 11 番地の 1

TEL：075-541-6249 FAX：075-541-6343

E-mail：exorption-contact@sanyo-chemical.group

URL：https://sanyo-chemical.co.jp/