

MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Q&A

2016年11月24日作成

- キットの仕様、性能について・・・P.1
- 従来法との比較について・・・P.2
- キットの操作法、組成について・・・P.3
- サンプル量について・・・P.4
- エクソソーム抽出後の解析について・・・P.4
- エクソソームマーカーについて・・・P.5
- 関連製品について・・・P.5

■ **キットの仕様、性能について**

Q1: 本キットは抗体を使用しているのか?

使用していません。金属イオン存在下でホスファチジルセリン (PS) に結合するタンパク質を使用しています。

Q2: 本キットでどのような細胞外小胞 (Extracellular Vesicles : EVs) が精製できるか?

PS を脂質膜表面に露出しているエクソソームやマイクロベジクルなどの Large EVs は、精製することができます。

Q3: エクソソームとマイクロベジクルの違いは何か?

エクソソームは、後期エンドソームに由来する粒径 40~100nm 程度の細胞外小胞です。マイクロベジクルは、細胞膜に由来する粒径 100~1,000nm 程度の細胞外小胞です。

Q4: エクソソームとマイクロベジクルを別々に精製できるか?

できます。両方を一緒に精製する場合は、サンプルを 1,200×g で遠心分離した上清をサンプルとして用います。エクソソームを精製する場合は、10,000×g で遠心分離した上清サンプルを用います。また、マイクロベジクルを精製する場合は、10,000×g で遠心分離した沈殿を TBS に懸濁したサンプルを用います。サンプルの前処理条件の詳細は取扱説明書に記載しておりますのでご参照ください。

Q5: エンベロープ型ウイルスも回収してしまうのか?

回収します。エンベロープ型のウイルスの膜表面にも PS が露出しているため、エンベロープ型ウイルスが混入しているサンプルでは、両方回収されます。分離したい場合は、本キ

ットで回収後、ウィルスまたはエクソソームに特異的な抗原に対する抗体を用いたアフィニティー精製をさらに行う必要があります。

Q6：全てのエクソソームが PS を露出しているのか？

全てのエクソソームが PS を露出していることを示す知見は得られていません。エクソソームの膜脂質成分を解析した論文で用いられた何種類かの細胞（マウスオリゴデンドロサイトなど）由来のエクソソームにおいては存在が確かめられています。しかし、PS を露出していない、または PS 露出量が少ないエクソソームが存在する可能性はあり、そのようなエクソソームは本キットでは回収できません。

Q7：どのようなサンプルから精製できるか？

細胞培養上清、血清、尿から回収した実績があります。

キレート剤（EDTA およびクエン酸）処理血漿からエクソソームを回収したい場合、限外ろ過でバッファー交換を行うことによって回収可能となります。プロトコールは、HP のリンク関係をご参照ください。お客様実績で、血漿、髄液からの回収も確認できています。

Q8：1回あたりのエクソソームの取得量は？

サンプルの種類や量により大きく異なりますが、当社実績で1回の単離でタンパク質量にして最大 30 μ g 程度 (BCA 法で測定)、粒子数にして $1\sim 2\times 10^{10}$ の粒子 (NanoSight LM10 で測定) が回収できています (モネンシンナトリウムでエクソソーム分泌を亢進させた K562 培養上清 5mL から回収)。

また健常人プール血清 1mL から 5×10^9 程度の粒子 (NanoSight LM10 で測定) が回収できています。

■従来法との比較について

Q9：超遠心分離法と比べた場合の利点は？

超遠心分離法よりも高純度なエクソソームを簡便に再現性良く高い効率で回収することができます。また、超遠心分離法では沈殿しないようなエクソソームを回収することも確認しております。

Q10：従来の抗体を用いたアフィニティー法と比べた場合の利点は？

抗体を用いたアフィニティー法は、エクソソーム表面抗原に対する抗体を用いているため変性剤による溶出を行う必要がありましたが、本キットは、キレート剤を用いて中性条件下で溶出できるため、インタクトなエクソソームを回収することができます。また、変性剤を用いた溶出が必要ないため、ビーズに非特異吸着したタンパク質の混入が少なく、より高純度なエクソソームを取得することができます。さらに回収効率も高いことを確認し

ております。1種類のエクソソーム表面マーカートンパク質をターゲットとした従来のアフィニティー法より、膜脂質成分をターゲットとした本キットはよりユニバーサルにエクソソームが取得できるものと考えられます。また、表面マーカートンパク質を認識する抗体は異なる動物種の抗原を認識しないケースもありますが、本キットは広い範囲の動物種で利用可能です（ヒト、マウス、ウシで実績があります）。

Q11：他法に比べた場合の回収純度は？

従来の沈殿法（超遠心分離法、ポリマー沈殿法）や抗体を用いた従来のアフィニティー法よりも高純度です。超遠心分離法と密度勾配遠心法を組み合わせた場合と同等レベルの高純度なエクソソームを簡便に取得することができます。

Q12：他法に比べた場合の回収効率？

ポリマー沈殿法よりは回収効率は低いですが、超遠心分離法や抗体を用いた従来のアフィニティー法よりは、回収効率は高いです。

■キットの操作法、組成について

Q13：本キットの操作時間は？

サンプル前処理が約1時間、キット工程は3時間30分です（Exosome Captureのビーズへの固定化が約15分間、サンプルとの反応が3時間、エクソソームの洗浄溶出が約15分）。

Q14：本キットの操作で、特に慎重に行った方がよい操作は？

- ・ Exosome Capture 固定化ビーズとサンプルを反応させた後の洗浄ステップの最終段階で洗浄液をしっかりと除去することです。完全に除去した後、溶出操作に入ってください。
- ・ 溶出ステップでビーズに溶出液を加えた後、ビーズが凝集していないか確認しながらしっかりと懸濁してください。

Q15：溶出液の組成は何か？

1mMのキレート剤、塩、防腐剤を含むTrisベースの溶液です。これらの成分がその後の解析を阻害する可能性がある場合は、限外濾過（ザルトリウス社 VivaSpin500、分画分子量100K、メーカーコード：VS0141）により、適切なバッファーに置換してください。

Q16：Exosome Captureを固定化した使用後の磁気ビーズのリサイクルは可能か？

可能です。サンプル中のエクソソームを効率よく回収できるよう、5回まで繰り返し使用できるプロトコールを設定しています。キット添付バッファー類は5回使用できる量が含まれています。1mL以上の容量のサンプルから回収を行う場合や濃縮サンプルから回収

する場合にお奨めします。同じサンプルから精製を繰り返すことで回収効率を上げることができます。詳しくは取扱説明書をご参照ください。

Q17: Exosome Capture 固定化磁気ビーズの保存は可能か?

可能です。エクソソームを溶出した後の Exosome Capture 固定化ビーズを再利用する場合は、キット添付の Washing buffer または自家調製した TBS を用いて冷蔵保存してください。

Q18: 実験操作を翌日まで持ち越せるステップは?

Exosome Capture 固定化ビーズとサンプルを反応させるステップ（反応時間 3 時間）は終夜で反応させても問題ありません。

■ サンプル量について

Q19: 精製に用いるサンプルの最低必要量は?

安定的にビーズとサンプルを混合するために、ローテーターを用いて反応を行う場合は 500 μ L 以上、チューブミキサーを用いて反応を行う場合は 100 μ L 以上のサンプルを用いて下さい。これより少ない量のサンプルを用いる場合は TBS を加えて最低必要量以上としてから Exosome Capture 固定化ビーズと反応させてください。

Q20: 多量のサンプルから回収できるか?

濃縮することにより対応できます。細胞培養上清の場合、50mL までのサンプルに対応できます。遠心分離前処理済みの上清 50mL を 1mL まで限外濾過濃縮してください。

（推奨フィルター：ザルトリウス社 VivaSpin20、分画分子量 100K、メーカーコード：VS2041）

無血清培地、10%FBS 添加培地にも対応できます。詳しくは取扱説明書をご参照ください。血清サンプルは濃縮できないため、使用できるのは 10mL までです。ただし 1mL 以上の血清は回収効率が低下するため、使用後の磁気ビーズを用いて精製を繰り返すことをお奨めします。

■ エクソソーム抽出後の解析について

Q21: エクソソームの中にはどのようなものが含まれているか?

タンパク質や脂質、核酸（DNA、microRNA、mRNA）などが含まれていることが報告されています。

Q22: 精製した細胞外小胞は、どういった解析に使用できるか?

インタクトな細胞外小胞が得られますので、あらゆる解析に利用できます。

- (例)・タンパク質解析：タンパク質電気泳動、ウェスタンブロット、MASS 解析、フローサイトメトリー、ELISA など
- ・核酸解析：qPCR、マイクロアレイ、次世代シーケンスなど
 - ・粒子解析：電子顕微鏡解析、NanoSight 解析 (NTA) など
 - ・機能解析：*in vitro*、*in vivo* での投与実験など

Q23：精製した細胞外小胞(EVs)はそのまま細胞への添加実験に利用できるか？

注意点はありますが、できます。溶出液の成分が問題になる場合は、上記 Q15 を参考に適切なバッファーに置換してください。また、遠心式フィルターユニット (Millipore 社 Ultrafree - MC, GV 0.22 μ m 滅菌済み、メーカーコード：UFC30GV0S) を用いて除菌を行ってください。

Q24：電子顕微鏡解析するために必要なエクソソーム量は？

当社の実績では $2\sim 4\times 10^{10}$ の粒子 (NanoSight LM10 で測定) を電子顕微鏡解析に用いました。

Q25：精製した細胞外小胞の保存条件は？

冷蔵または冷凍で保管してください。また長期間保存する場合は -80°C で保管してください。凍結保存する場合は凍結融解を避けるため、小分け保存することをお奨めします。

Q26：回収したエクソソーム抽出液から WB へ持って行きたいが、どうすればいいか？

弊社研究所では、回収した抽出液 100ul から 15ul をとり、5ul の $4\times$ SDS サンプルバッファー を加えて 20ul のサンプルに調整した後、SDS-PAGE に全量アプライしています。パンフレットに記載の WB のサンプル量も同条件で実施しています。

■エクソソームマーカーについて

Q27：本キットで精製したエクソソームはどのように確認しているか？

表面抗原に対する抗体を用いたウェスタンブロッティング、電子顕微鏡、密度勾配遠心分離、粒子径測定 (NanoSight LM10) などで確認しています。

Q28：エクソソーム精製後、ウェスタンブロットで確認しているマーカータンパク質は何か？

CD9, CD63, CD81, Tsg101 Alix Flotillin-2, Lamp-1 などです。

■関連製品について

Q29：ウェスタンブロットで利用可能なエクソソームマーカー検出抗体は販売している

か？

当社で使用実績のある下記抗体を販売しています。

Novus 社 抗 CD81 マウスモノクローナル抗体(1D6) メーカーコード：NB100-65805

Novus 社 抗 Tsg101 マウスモノクローナル抗体(4A10) メーカーコード：NB200-112

Novus 社 抗 Alix マウスモノクローナル抗体(3A9) メーカーコード：NB100-65678

Q30：精製した細胞外小胞(EVs)から RNA を精製するキットは販売しているか？

販売しています。microRNA Extractor SP Kit (コード：295-71701) を利用することで、AGPC 法よりも効率よく microRNA と mRNA を精製することができます。

Q31：磁気スタンドは販売しているか？

販売していません。サーモサイエンティフィック社 DynaMag-2 (メーカーコード：12321D) などをご利用下さい。