EVs

エクソソームを含む
細胞外小胞
ハンドブック

コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

＜お詫び＞ コスモバイオニュース掲載商品 誤記のお詫びと訂正

コスモ・バイオ　EV s ハンドブックの記載内容に誤りがございました。深くお詫び申し上げますとともに、以下の通り訂正させていただきます。

該当箇所

■ 95 ページ

・「がんの検出と治療におけるエクソソームのバイオマーカー」の文章の参考文献情報

記載の文章

参考文献：

1) Figure from Yu et al . 2022.1 Reproduced under the Creative Commons license.

2) Yu, D., Li, Y., Wang, M., Gu, J., Xu, W., Cai, H., Fang, X., & Zhang, X. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. Molecular Cancer 21 (2022). https://doi.org/10.1186/s12943-022-01509-9

正しい文章

参照：

Yu, D., Li, Y., Wang, M. et al. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. Mol Cancer 21, 56 (2022). (https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-022-01509-9)、Licenced Under CC BY 4.0（https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/）

■ 96 ページ

・「エクソソーム　― 小さな「プレイヤー」が果たす大きな役割 ―」の文章のお礼

記載忘れの文章　本原稿をご寄稿いただいた株式会社プロテインテックに心よりお礼申し上げます。

■ 114 ページ

・品番：PS-1 の標準価格（税別）

記載の標準価格　￥800,000～

正しい標準価格　ご照会

・品番：PS-1 の備考

記載の備考　精製タンパク質　1.5 mg

正しい備考　精製タンパク質　1.0 ng (目標量)

・品番：QE-1、QE-2 のサービス内容

記載のサービス内容　（コスモ・バイオ社製）の受託測定

正しい記載内容　（ハカレル社製）の受託測定

ご迷惑をおかけいたしました事をお詫び申し上げます。

Contents

総　説

身近になりつつあるエクソソーム：宝箱を開ける“鍵”はどこに？
東京医科大学 医学総合研究所 分子細胞治療研究部門　吉岡 祐亮 先生　p. 2

第 1 章　機能解析

タンパク質抽出

連続的にエクソソーム精製およびエクソソームタンパク質抽出
DiagExo® 血清エクソソーマルタンパク質抽出キット　p. 8

精製済みエクソソームから界面活性剤を含まないトータルタンパク質抽出
エクソソームタンパク質抽出キット（界面活性剤フリー）　p. 9

RNA / タンパク質抽出

精製済みのエクソソームから RNA およびタンパク質を抽出
エクソソーム由来の RNA およびタンパク質抽出キット　p. 10

RNA 抽出

エクソソーム（血漿／血清由来）精製後に RNA 分離
血漿／血清エクソソーム精製 & RNA 分離キット　p. 11

エクソソーム（尿由来）精製後に RNA 分離
尿用 エクソソーム精製 & RNA 分離キット　p. 12

エクソソーム（尿由来）から一気に RNA 精製
尿中のエクソソーム RNA 精製キット　p. 13

エクソソーム（細胞培養上清由来）精製後に RNA 分離
細胞培養上清用 エクソソーム精製 & RNA 分離キット　p. 15

精製済みのエクソソームから RNA 分離
エクソソーム RNA 分離キット　p. 16

サンプルから small RNA を単離
TraPR small RNA 単離キット　p. 17

DNA 抽出

精製済みのエクソソームから DNA 分離
エクソソーム由来の DNA 抽出キット　p. 19

遺伝子操作

miRNA 導入　ExoFectin® sRNA-into-Exosome Kit（Electro）　p. 20

miRNA 阻害核酸　CL-AMO　miRNA 阻害核酸　p. 21

ターゲット検出　miRNAscope™ miRNA *in situ* hybridization　p. 23

miRNA の cDNA 増幅
microScript microRNA cDNA 合成キット　p. 25

ライブラリ調製　Small RNA-Seq Library Prep Kit　p. 26

観察

超解像光学顕微鏡用
ExoBrite™ STORM EV Membrane Staining Kits　p. 27

エクソソームの膜染色
脂質膜染色蛍光色素 CellBrite® Steady　p. 28

透過型電子顕微鏡用
Exosome-TEM-easy キット　p. 30

表紙解説　「鞠」を「細胞外小胞」に見立てて

日本古来からの球技、蹴鞠（けまり）で競われたのは、次の人に鞠をつなぎ、どれだけ多く蹴っていられるかということや、その所作の美しさであるといいます。

伝達物質を内蔵し、細胞から細胞へとやり取りされるエクソソームを代表とした EVs（Extracellular Vesicles/ 細胞外小胞）。

次につなぎ、伝えたいものは何なのか？
その謎を解く一助にこのハンドブックがなれますと幸いです。

【参考】
楊洲周延『千代田之御表　蹴鞠』, 福田初次郎 , 明治３０.
国立国会図書館デジタルコレクション
https://dl.ndl.go.jp/pid/1302634 (参照 2023-07-21)

第 2 章　基礎（調製・検出）

コラム　微生物由来細胞外小胞とミルクエクソソーム　p. 32

EVs・EVs 産生

微生物由来　p. 33
ヒト由来、細胞培養上清由来　p. 35
間葉系幹細胞由来　p. 37
ミルク由来　p. 37
母乳由来　p. 38
蛍光標識したエクソソーム（FLuoEVs）　p. 39
FBS からのエクソソーム除去キット　p. 40

EVs 精製

EVs の精製方法　p. 42
密度勾配遠心分離媒体、OptiPrep™　p. 44
抗体アフィニティー、免疫沈降（ExoTrap™、Fab-TACS®）　p. 45
ポリマー沈殿法（EXO-Prep）　p. 49
サイズ排除（SEC）（PURE-EV）　p. 50
タンジェンシャルフローろ過（TFF-Evs など）　p. 51
EV 用イオン交換法（EV-Capture™）　p. 53
その他の商品独自方法
（PureExo®、DiagExo®、Norgen 社商品など）　p. 55
限外ろ過（UF）濃縮装置（EV-Spinner）　p. 63

エクソソームマーカー抗体

おすすめ抗体を多数ご紹介しています。

コラム　エクソソームマーカー　p. 64

ELISA　p. 73

FC / FCCS

フローサイトメトリー用のキット　p. 84
FACS 解析キット　p. 87
蛍光検出器　SMART FCCS　p. 89

総　説　FCS と FCCS　その特徴と今後の展開へ向けて　― エクソソーム研究にも利用可能な FCS と FCCS ―　p. 92
北海道大学 大学院先端生命科学研究院 細胞機能科学研究室　金城 政孝 先生

第 3 章　リキッドバイオプシー

コラム　エクソソーム　― 小さな「プレイヤー」が果たす大きな役割 ―　p. 96

cf-DNA / cf-RNA 精製

循環セルフリー DNA 精製キット（血漿／血清用、尿用）　p. 97
cfPure® セルフリー DNA（cfDNA）精製キット（血漿／血清用）　p. 100
循環セルフリー RNA 精製キット（尿用）　p. 101
エクソソーム精製 & 遊離循環 RNA 分離キット
（血漿／血清用、尿用）　p. 103
遊離 RNA 精製キット - Slurry Format
（血清／血漿用、全サイズ RNA 分離）　p. 105
循環セルフリー & ウイルス核酸精製キット
（血漿／血清用、尿用）　p. 106
血漿中 cf-DNA / cf-RNA 保存チューブ　p. 108

その他

SeleCTEV™ DNA Enrichment Kit　p. 109
NEXTflex™ Cell Free DNA-Seq Kit 2.0　p. 110
evGAG Extracellular vesicles Purification Kit　p. 111

第 4 章　受託サービス

エクソソームのプロテオーム解析受託サービス　p. 113
エクソソーム検出ツール作製受託サービス　p. 114
フローサイトメトリー（FACS）受託解析サービス　p. 115
クライオ電子顕微鏡を用いたエクソソーム等の観察受託サービス　p. 116

技術情報

非イオン性、等浸透圧勾配による密度勾配遠心　― OptiPrep™の使い方 ―　p. 117
密度勾配遠心 アプリケーション　― 哺乳類細胞と馴化培地からのエクソソームとマイクロベシクルの精製 ―　p. 119

身近になりつつあるエクソソーム：宝箱を開ける“鍵”はどこに？

東京医科大学 医学総合研究所 分子細胞治療研究部門

吉岡 祐亮 先生

はじめに

筆者は小学生の頃、テレビゲームが好きで、特に RPG を好んでいた。ドラゴンクエストやファイナルファンタジーと言ったゲームには、かなりの時間を費やした。このようなゲームの中で必ずと言っていいほど、出てくるものが宝箱だ。中には貴重なアイテムやストーリーの進行に欠かせないものが入っていたりする場合もあって、宝箱を見つけるとワクワクした記憶がある。しかし、鍵が掛かっている宝箱も度々あり、開けられない時はどうしたものかと悩んだ。ストーリーの後半に手にいれる鍵もあれば、近くの敵を倒せば手に入る時など様々だが、鍵が掛かっている=重要なアイテムが入っている、という認識で、どうしてもその宝箱が気になってしまうのだ。

そのうち、中学生、高校生となるに連れ、あれだけやっていたゲームをしなくなり、気がつけば、大学院生となっていたのだが、そこでまたしても、鍵が掛かった宝箱（と思われるもの）に出会った。それが、エクソソームだ。もちろん、宝箱も鍵も“比喩”であり、エクソソームには鍵も掛かっていないし、宝箱のように何か冒険に必要なアイテムが入っているわけではない。しかし、エクソソームの中には、様々な分子が詰め込まれており、それらを上手く使いこなすこと（=鍵を使って開けること）で、宝箱のような存在になりうるのだ。人々がエクソソームという宝箱に気づいてから、かなり時間が経っており、現状、この宝箱を開けることができたのか、そして、私たちとエクソソームの関わりが将来どのようになっていくのかを考え、概説する。

エクソソームは分子の複合体

エクソソームを始めとする細胞外小胞は、かなりバラエティに富んでいる。“バラエティ”という単語は便利であり、何となく多様性があり複雑な、何でもありな感じがしてしまう。ここで言うバラエティとは、細胞外小胞を構成する分子の多様性を指す。エクソソームの定義を思い返してみると、細胞がエンドソームを経由して分泌する脂質二重膜を有する小胞である [1]。つまり、分泌する細胞の種類や特定の分子の有無については言及されていない。なぜなら、様々な細胞が小胞を分泌するし、それらの構成分子は多岐に渡り、タンパク質、mRNA や miRNA などの核酸、脂質、代謝産物などカテゴリーの異なる分子群が含まれており [1]、特定の分子で定義することが難しいからである。それは他の細胞外小胞でも同じことが言える。これら分子がいくつもの組み合わせでエクソソームに含まれることから、エクソソームはバラエティに富んでいると言える [2]。このような多種多様な細胞外小胞が細胞間コミュニケーションツールとして働くことは、多彩な生命現象を制御している一因であろう。例えば、細胞間情報伝達物質として、サイトカインなどが有名であるが、これらは主に 1 つのタンパク質を用いて特定のレセプターを発現している細胞へと伝達する様式であり、免疫系や造血系の細胞でのやりとりが多い。サイトカインの種類自体は多いものの、バラエティに富んでいると言うよりは、微量で特異的な細胞に対して生理作用を示し、一対一対応のような一様な存在と感じる。話を戻すと、エクソソームはサイトカインのような、ハッキリとした存在ではなく、分子から規定するのが難しい存在である。

また、エクソソームの構成分子は、由来する細胞や細胞が置かれている状況によって異なることが示されており、構成分子のバラエティを生み出している要因の一つとなっている [2]。それと同時に、細胞は自身のアイデンティティや状況を伝えるメッセージを分子として、エクソソームに詰め込んで分泌している。つまり、エクソソームの構成分子を覗き見ることで、どのような細胞が、どのような状況で、何のために分泌したか分かるかもしれない。実は、このことがエクソソームを宝箱と思える理由に繋がっている。例えば、エクソソームの構成分子を解析することで、分泌した細胞を特定し、その細胞の状況を把握した時、それが、がん細胞のもので、まさに転移しようとする状況ということを知れたら、エクソソームは宝箱となりうるのではないだろうか。

エクソソームリキッドバイオプシーの可能性

ゲームにおいて、誰がどのような理由で宝箱を設置したのかは、考えれば考えるほど謎である。ストーリー上、その理由が分かるものもあるのだが、大半は分からないし、敵がわざわざ設置してくれたと考えると何がしたいのか分からない。しかし、前述したようにエクソソー

ムにおいては、中身を見ることで、どのような細胞がどういった理由で分泌したのかが分かる可能性がある。この事を利用したのが、リキッドバイオプシーによる疾患診断である。細胞外小胞はわれわれの体液中を循環しており、現状の技術では正確な数は算出できないが、Nanoparticle tracking analysis を用いると、血液中では、約～10^{11} 個 /mL、尿中では約～10^{10} 個 /mL、とかなり多くの細胞外小胞が存在していると考えられている。体液を採取し、そこに含まれるエクソソームの中に、疾患のアイデンティティを示す分子を見出せれば、疾患診断の手がかりになりうる。実際、エクソソームによるリキッドバイオプシーの開発は世界中で活発化しており、現在、最も開発が進んでいる例として、アメリカの Exosome Diagnostic 社（現在は Bio-Techne 社に買収されている）が 2016 年に上市した ExoDx Lung シリーズや ExoDx Prostate が挙げられる。これら検査は主にエクソソームに含まれる RNA を検出することで、ExoDx Lung シリーズは ALK や EGFR に対する分子標的薬のコンパニオン診断薬に [3]、ExoDx Prostate は 3 種類の RNA（PCA3、ERG、SPDEF）を測定することで、PSA 検査で高値を示した患者に対して、前立腺生検の必要性を判断する際の補助診断薬としている [4,5]。特に、尿中エクソソームを解析する ExoDx Prostate は 2019 年より FDA から Breakthrough Device Designation（画期的医療機器／デバイス指定）を受け、臨床での実用が期待されている。日本でも、いくつかのベンチャー企業がエクソソームリキッドバイオプシーによる検査の実用化を目指しており、例えば、尿中のエクソソーム miRNA を標的としている Craif 社や [6,7]、エクソソームタンパク質によるがん診断を目指しているテオリアサイエンス社 [8,9]、涙液による乳がん診断法を開発している TearExo 社などが挙げられる [10,11]。今後も実用化に向けた動きは過熱すると思われる。しかし、われわれは、リキッドバイオプシーにおける宝箱を開ける鍵は手に入れているのだろうか？この場合、宝箱を開ける鍵は、いくつかあると考えられる。一つは、疾患のアイデンティティを示す分子を明らかにすることだろう。特定の疾患における特異的なエクソソーム分子を明らかにすることができなければ、リキッドバイオプシーが成立しないため、これが文字通り鍵となる。そして 2 つ目の鍵は、特異的な分子をどのように検出するか、である。前述したように、われわれの体液中には多くの細胞外小胞が循環しているが、疾患に由来するエクソソームは、極わずかである。そのため、ノイズとなる正常細胞由来のエクソソームを掻き分け、重要アイテムが入っている疾患由来のエクソソームだけを開けなければ、永遠と空の宝箱を開けることとなる。エクソソーム中の目的分子を感度高く検出する方法が必要で、さらに、検出にはどのくらいの時間や手間、コストがかかるのかを吟味しなければならない。また、3 つ目の鍵としては、検査に用いる検体の品質を一定にすることで、体液中のエクソソームの量や質を均一化することである。さらに現状定まっていない、インナーコントロールを定めることで、エクソソームの回収効率や個人差を考慮することができ、安定した検査結果へと繋がるだろう。

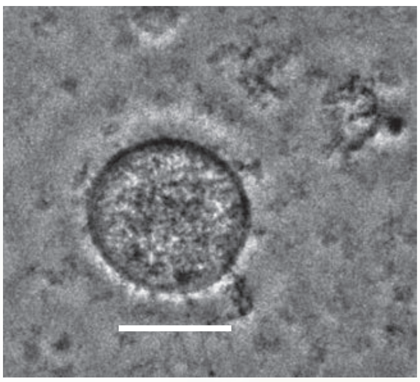


図　膵臓がん患者血清から回収したエクソソーム
膵臓がん患者の血清に含まれるエクソソームの電子顕微鏡像。100 nm サイズのエクソソームの中身を電子顕微鏡では見ることはできないが、中には貴重なお宝が入っているかもしれない。
スケールバー：100 nm

エクソソームは治療製剤になりうるか

ゲームにおいて宝箱は冒険の手助けになるアイテムが入っている。これは現実世界の宝箱であるエクソソームにおいても同様で、リキッドバイオプシーによる疾患診断の手助けになることに加えて、治療効果を有する分子（アイテム）が入っており、治療に用いることも可能である。その代表格は、間葉系幹細胞（MSC）に代表される幹細胞由来の細胞外小胞である。もともと、多分化能を持つ MSC は再生医療の代表としても有望視されており、組織再生や機能回復に重要なサイトカインなどの液性因子を分泌していることが知られている [12,13]。近年、液性因子の一つであるエクソソームが損傷を起こした組織の修復に有効であることや抗炎症作用、抗線維化作用、免疫抑制作用などの様々な機能を示すことが注目されている。実際に、臨床試験においても治療効果が確認されており、オーストリアとドイツのグループは人工内耳装着による副反応の炎症を抑える目的として内耳に臍帯由来 MSC の細胞外小胞を添加する臨床試験を行い、音声知覚の改善が認められた [14]。MSC の細胞外小胞による治療効果が得られる疾患は、肝硬変 [15]、アルツハイマー [16]、慢性閉塞生肺疾患 [17]、腎疾患 [18]、リンパ浮腫 [19]、変形性膝関節症 [20] など多岐に渡り、現在、MSC の細胞外小胞を用いた臨床試験も世界中で多く行われている。この宝箱の中身である mRNA を解析すると、歯髄由来の MSC からは神経形成に関する分子を、脂肪由来の MSC からは血管形成に関する分子が豊富に含まれており、両 MSC 由来 EV に共通して発毛関連や皮膚基質関連の分子が多く含まれていた [21]。つまり、由来する MSC によってエクソソームの中身は少し異なるものの、いずれも組織修復や再生に関わる分子が多く含まれていた。日本でも慈恵医科大学らのグループを中心に、気道上皮細胞由来のエクソソームとなるが、特発性肺線維症に対する治療開発が行われ [22]、すでに PMDA との対面助言まで進んでおり、臨床試験までの工程が見えてきており、実用化に期待がかかっている。

上記は、エクソソームそのものが治療効果を有していることを利用した例であるが、エクソソームに治療効果を付与したり、siRNA や miRNA、低分子化合物を標的細胞に届けるための（宝箱ではなく）ギフトボックスとして、利用する例もある。この分野で、先陣を切って応用化を目指していたのはアメリカの Codiak Biosciences 社であった。なぜ、過去形で記載しているか、結論から言うと、Codiak Biosciences 社の計画は頓挫したからである。2022 年 8 月末には大規模リストラを行い、社内整備を行なったものの、2023 年 3 月には破産申告がされた。Codiak Biosciences 社は改変型エクソソー

ムを作製する技術に強みがある。Prostaglandin F2 receptor negative regulator（PTGFRN）をエクソソーム膜上に露出させることで、腫瘍への送達性をあげ、さらに、STING 経路の活性化を誘導する STING アゴニストを内包させたエクソソーム（exoSTING）[23]、および、エクソソーム表面に IL–12 を搭載させ、IL–12 ががん局所で作用するエクソソーム（exoIL–12）を開発し [24]、2020 年にはこれらの臨床試験をスタートさせた。さらに、2021 年には Lonza 社が Codiak Biosciences 社のエクソソーム製造設備を買収し、本格的なエクソソーム製剤の製造拠点を築こうとしていた。その矢先の破産申告であり、正確な原因は不明だが、臨床試験が上手く行かなかった可能性が考えられる。Codiak Biosciences 社の例は、エクソソームという宝箱を開けることが一筋縄で行かないことを示した例と言えるだろう。Codiak Biosciences 社がエクソソーム製剤を実用化できなかった正確な理由は分からないが、エクソソームを治療用製剤に用いる際の鍵となるポイントについて考えてみよう。一つは、エクソソームの安定的な供給が必須であり、そのための GMP グレードの細胞の大量培養系および高効率かつ純度の高いエクソソームの回収方法の存在が不可欠である点が挙げられる。現状、特に後者のエクソソーム回収法についてはベストな方法が長い間、模索されているにも関わらず、決定打に欠けている。もう一つは、エクソソームが分子の複合体であることに起因して、治療効果を発揮する分子がどれであるのか特定できない、そして、作用機序が明らかではない場合があることだ。例えば、MSC 由来のエクソソームが抗炎症作用を示すという場合でも、エクソソーム中に存在する多数の分子のうち、どの分子が抗炎症作用を発揮しているか分からないし、単一の分子とも限らず、複数存在している可能性もある。主となる分子や作用機序が不明でも治療薬として使用することは可能なのだが、生産過程における品質管理の際に、治療効果を有するエクソソームがどの程度含まれているのか、目的外のエクソソームがどの程度含まれているのかを評価する系や治療効果を安定的に評価できる系の構築が求められるだろう。

おわりに

エクソソームという宝箱を開けるための鍵は、徐々に揃い始めてきた。特に、リキッドバイオプシーの分野では、宝箱の中身が次々と開けられ、どの細胞に由来するのか、そのメッセージを解き明かそうと様々な解析・探索が行われてきた。ただし、今までの報告は、小規模な解析検体数であったり、単一施設による限定的な状況の結果であることが多く、実用化に向けて、更なる検証が必要だろう。また、エクソソームを用いた治療製剤の開発についても課題は多いものの、着実に進んでいることが窺える。その理由の一つに、PMDA が 2021 年に、エクソソームを含む細胞外小胞（EV）を利用した治療用製剤に関する専門部会を立ち上げて、2023 年 1 月に報告書をまとめたことからも、細胞外小胞を治療用製剤に用いることがすでに想定されているのだろう。エクソソームが私たちの身近な生活に入ってくるのはまだ先かもしれないが、どんな RPG だって、最初からレベル 99 でラスボスを倒すところからは始まらず、レベル 1 から進めて行くしかないのと同じで、ちょっとずつエンディングを目指すしかない。そうして、エンディングに辿り着くころには、毎年、エクソソームによる疾患検査を受けて、疾患が見つかればエクソソーム治療製剤で治療し、日頃の健康維持のためにエクソソーム入りの健康食品を食べ、肌のハリを保つため、エクソソーム入りの化粧水を使い、薄くなった頭皮にエクソソーム入り育毛剤を使っている将来があるかもしれない。

ちなみに、ゲーム内では時たま宝箱を開けるとお宝ではなく、敵（ミミック）が現れて、痛い目を見ることがある。このパターンはエクソソームにも存在している。それは、がん細胞などのエクソソームである。リキッドバイオプシーの観点から見ると、診断の手助けするお宝が入っているように見えるが、がん細胞のエクソソームは、がん悪性化に繋がる分子を豊富に含み、実際に転移などの悪性化を引き起こす要因の一つとなっており、悪玉エクソソームと位置付けできる [25] [26] [27]。しかし、ゲーム内では、ミミックを倒すとアイテムを貰えることが多くあり、お宝があることには違いないので、筆者は、“この宝箱はミミックだ”と分かっていても開けるタイプである。その性格とは関係ないのだろうが、がん細胞エクソソームを倒して（解析して）、お宝である疾患のメカニズム解明に繋がる研究も好きである。

参考文献

[1] C. Théry, K.W. Witwer, E. Aikawa, M.J. Alcaraz, J.D. Anderson, R. Andriantsitohaina, A. Antoniou, T. Arab, F. Archer, G.K. Atkin-Smith, D.C. Ayre, J.M. Bach, D. Bachurski, H. Baharvand, L. Balaj, S. Baldacchino, N.N. Bauer, A.A. Baxter, M. Bebawy, C. Beckham, A. Bedina Zavec, A. Benmoussa, A.C. Berardi, P. Bergese, E. Bielska, C. Blenkiron, S. Bobis-Wozowicz, E. Boilard, W. Boireau, A. Bongiovanni, F.E. Borràs, S. Bosch, C.M. Boulanger, X. Breakefield, A.M. Breglio, M. Brennan, D.R. Brigstock, A. Brisson, M.L. Broekman, J.F. Bromberg, P. Bryl-Górecka, S. Buch, A.H. Buck, D. Burger, S. Busatto, D. Buschmann, B. Bussolati, E.I. Buzás, J.B. Byrd, G. Camussi, D.R. Carter, S. Caruso, L.W. Chamley, Y.T. Chang, C. Chen, S. Chen, L. Cheng, A.R. Chin, A. Clayton, S.P. Clerici, A. Cocks, E. Cocucci, R.J. Coffey, A. Cordeiro-da-Silva, Y. Couch, F.A. Coumans, B. Coyle, R. Crescitelli, M.F. Criado, C. D'Souza-Schorey, S. Das, A. Datta Chaudhuri, P. de Candia, E.F. De Santana, O. De Wever, H.A. Del Portillo, T. Demaret, S. Deville, A. Devitt, B. Dhondt, D. Di Vizio, L.C. Dieterich, V. Dolo, A.P. Dominguez Rubio, M. Dominici, M.R. Dourado, T.A. Driedonks, F.V. Duarte, H.M. Duncan, R.M. Eichenberger, K. Ekström, S. El Andaloussi, C. Elie-Caille, U. Erdbrügger, J.M. Falcón-Pérez, F. Fatima, J.E. Fish, M. Flores-Bellver, A. Försönits, A. Frelet-Barrand, F. Fricke, G. Fuhrmann, S. Gabrielsson, A. Gámez-Valero, C. Gardiner, K. Gärtner, R. Gaudin, Y.S. Gho, B. Giebel, C. Gilbert, M. Gimona, I. Giusti, D.C. Goberdhan, A. Görgens, S.M. Gorski, D.W. Greening, J.C. Gross, A. Gualerzi, G.N. Gupta, D. Gustafson, A. Handberg, R.A. Haraszti, P. Harrison, H. Hegyesi, A. Hendrix, A.F. Hill, F.H. Hochberg, K.F. Hoffmann, B. Holder, H. Holthofer, B. Hosseinkhani, G. Hu, Y. Huang, V. Huber, S. Hunt, A.G. Ibrahim, T. Ikezu, J.M. Inal, M. Isin, A. Ivanova, H.K. Jackson, S. Jacobsen, S.M. Jay, M. Jayachandran, G. Jenster, L. Jiang, S.M. Johnson, J.C. Jones, A. Jong, T. Jovanovic-Talisman, S. Jung, R. Kalluri, S.I. Kano, S. Kaur, Y. Kawamura, E.T. Keller, D. Khamari, E. Khomyakova, A. Khvorova, P. Kierulf, K.P. Kim, T. Kislinger, M. Klingeborn, D.J. Klinke, 2nd, M. Kornek, M.M. Kosanović, F. Kovács Á, E.M. Krämer-Albers, S. Krasemann, M. Krause, I.V. Kurochkin, G.D. Kusuma, S. Kuypers, S. Laitinen, S.M. Langevin, L.R. Languino, J. Lannigan, C. Lässer, L.C. Laurent, G. Lavieu, E. Lázaro-Ibáñez, S. Le Lay, M.S. Lee, Y.X.F. Lee, D.S. Lemos, M. Lenassi, A. Leszczynska, I.T. Li, K. Liao, S.F. Libregts, E. Ligeti, R. Lim, S.K. Lim, A. Linē, K. Linnemannstöns, A. Llorente, C.A. Lombard, M.J. Lorenowicz, M. Lörincz Á, J. Lötvall, J. Lovett, M.C. Lowry, X. Loyer, Q. Lu, B. Lukomska, T.R. Lunavat, S.L. Maas, H. Malhi, A. Marcilla, J. Mariani, J. Mariscal, E.S. Martens-Uzunova, L. Martin-Jaular, M.C. Martinez, V.R. Martins, M. Mathieu, S. Mathivanan, M. Maugeri, L.K. McGinnis, M.J. McVey, D.G. Meckes, Jr., K.L. Meehan, I. Mertens, V.R. Minciacchi, A. Möller, M. Møller Jørgensen, A. Morales-Kastresana, J. Morhayim, F. Mullier, M. Muraca, L. Musante, V. Mussack, D.C. Muth, K.H. Myburgh, T. Najrana, M. Nawaz, I. Nazarenko, P. Nejsum, C. Neri, T. Neri, R. Nieuwland, L. Nimrichter, J.P. Nolan, E.N. Nolte-'t Hoen, N. Noren Hooten, L. O'Driscoll, T. O'Grady, A. O'Loghlen, T. Ochiya, M. Olivier, A. Ortiz, L.A. Ortiz, X. Osteikoetxea, O. Østergaard, M. Ostrowski, J. Park, D.M. Pegtel, H. Peinado, F. Perut, M.W. Pfaffl, D.G. Phinney, B.C. Pieters, R.C. Pink, D.S. Pisetsky, E. Pogge von Strandmann, I. Polakovicova, I.K. Poon, B.H. Powell, I. Prada, L. Pulliam, P. Quesenberry, A. Radeghieri, R.L. Raffai, S. Raimondo, J.

Rak, M.I. Ramirez, G. Raposo, M.S. Rayyan, N. Regev-Rudzki, F.L. Ricklefs, P.D. Robbins, D.D. Roberts, S.C. Rodrigues, E. Rohde, S. Rome, K.M. Rouschop, A. Rughetti, A.E. Russell, P. Saá, S. Sahoo, E. Salas-Huenuleo, C. Sánchez, J.A. Saugstad, M.J. Saul, R.M. Schiffelers, R. Schneider, T.H. Schøyen, A. Scott, E. Shahaj, S. Sharma, O. Shatnyeva, F. Shekari, G.V. Shelke, A.K. Shetty, K. Shiba, P.R. Siljander, A.M. Silva, A. Skowronek, O.L. Snyder, 2nd, R.P. Soares, B.W. Sódar, C. Soekmadji, J. Sotillo, P.D. Stahl, W. Stoorvogel, S.L. Stott, E.F. Strasser, S. Swift, H. Tahara, M. Tewari, K. Timms, S. Tiwari, R. Tixeira, M. Tkach, W.S. Toh, R. Tomasini, A.C. Torrecilhas, J.P. Tosar, V. Toxavidis, L. Urbanelli, P. Vader, B.W. van Balkom, S.G. van der Grein, J. Van Deun, M.J. van Herwijnen, K. Van Keuren-Jensen, G. van Niel, M.E. van Royen, A.J. van Wijnen, M.H. Vasconcelos, I.J. Vechetti, Jr., T.D. Veit, L.J. Vella, É. Velot, F.J. Verweij, B. Vestad, J.L. Viñas, T. Visnovitz, K.V. Vukman, J. Wahlgren, D.C. Watson, M.H. Wauben, A. Weaver, J.P. Webber, V. Weber, A.M. Wehman, D.J. Weiss, J.A. Welsh, S. Wendt, A.M. Wheelock, Z. Wiener, L. Witte, J. Wolfram, A. Xagorari, P. Xander, J. Xu, X. Yan, M. Yáñez-Mó, H. Yin, Y. Yuana, V. Zappulli, J. Zarubova, V. Žėkas, J.Y. Zhang, Z. Zhao, L. Zheng, A.R. Zheutlin, A.M. Zickler, P. Zimmermann, A.M. Zivkovic, D. Zocco, E.K. Zuba-Surma, Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, *J Extracell Vesicles*. 7 (1) (2018) 1535750, https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750.

[2] R.T. Morales, J. Ko, Future of Digital Assays to Resolve Clinical Heterogeneity of Single Extracellular Vesicles, *ACS Nano*. 16 (8) (2022) 11619-11645, https://doi.org/10.1021/acsnano.2c04337.

[3] E. Castellanos-Rizaldos, D.G. Grimm, V. Tadigotla, J. Hurley, J. Healy, P.L. Neal, M. Sher, R. Venkatesan, C. Karlovich, M. Raponi, A. Krug, M. Noerholm, J. Tannous, B.A. Tannous, L.E. Raez, J.K. Skog, Exosome-Based Detection of EGFR T790M in Plasma from Non-Small Cell Lung Cancer Patients, *Clin Cancer Res*. 24 (12) (2018) 2944-2950, https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-17-3369.

[4] R. Tutrone, M.J. Donovan, P. Torkler, V. Tadigotla, T. McLain, M. Noerholm, J. Skog, J. McKiernan, Clinical utility of the exosome based ExoDx Prostate (IntelliScore) EPI test in men presenting for initial Biopsy with a PSA 2-10 ng/mL, *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 23 (4) (2020) 607-614, https://doi.org/10.1038/s41391-020-0237-z.

[5] R. Tutrone, B. Lowentritt, B. Neuman, M.J. Donovan, E. Hallmark, T.J. Cole, Y. Yao, C. Biesecker, S. Kumar, V. Verma, G.R. Sant, J. Alter, J. Skog, ExoDx prostate test as a predictor of outcomes of high-grade prostate cancer - an interim analysis, *Prostate Cancer Prostatic Dis* (2023), https://doi.org/10.1038/s41391-023-00675-1.

[6] T. Yasui, T. Yanagida, S. Ito, Y. Konakade, D. Takeshita, T. Naganawa, K. Nagashima, T. Shimada, N. Kaji, Y. Nakamura, I.A. Thiodorus, Y. He, S. Rahong, M. Kanai, H. Yukawa, T. Ochiya, T. Kawai, Y. Baba, Unveiling massive numbers of cancer-related urinary-microRNA candidates via nanowires, *Sci Adv*. 3 (12) (2017) e1701133, https://doi.org/10.1126/sciadv.1701133.

[7] Y. Kitano, K. Aoki, F. Ohka, S. Yamazaki, K. Motomura, K. Tanahashi, M. Hirano, T. Naganawa, M. Iida, Y. Shiraki, T. Nishikawa, H. Shimizu, J. Yamaguchi, S. Maeda, H. Suzuki, T. Wakabayashi, Y. Baba, T. Yasui, A. Natsume, Urinary MicroRNA-Based Diagnostic Model for Central Nervous System Tumors Using Nanowire Scaffolds, *ACS Appl Mater Interfaces*. 13 (15) (2021) 17316-17329, https://doi.org/10.1021/acsami.1c01754.

[8] Y. Yoshioka, M. Shimomura, K. Saito, H. Ishii, Y. Doki, H. Eguchi, T. Nakatsura, T. Itoi, M. Kuroda, M. Mori, T. Ochiya, Circulating cancer-associated extracellular vesicles as early detection and recurrence biomarkers for pancreatic cancer, *Cancer Sci*. 113 (10) (2022) 3498-3509, https://doi.org/10.1111/cas.15500.

[9] Y. Yoshioka, N. Kosaka, Y. Konishi, H. Ohta, H. Okamoto, H. Sonoda, R. Nonaka, H. Yamamoto, H. Ishii, M. Mori, K. Furuta, T. Nakajima, H. Hayashi, H. Sugisaki, H. Higashimoto, T. Kato, F. Takeshita, T. Ochiya, Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen, *Nat Commun*. 5 (2014) 3591, https://doi.org/10.1038/ncomms4591.

[10] T. Takeuchi, K. Mori, H. Sunayama, E. Takano, Y. Kitayama, T. Shimizu, Y. Hirose, S. Inubushi, R. Sasaki, H. Tanino, Antibody-Conjugated Signaling Nanocavities Fabricated by Dynamic Molding for Detecting Cancers Using Small Extracellular Vesicle Markers from Tears, *J Am Chem Soc*. 142 (14) (2020) 6617-6624, https://doi.org/10.1021/jacs.9b13874.

[11] K. Mori, M. Hirase, T. Morishige, E. Takano, H. Sunayama, Y. Kitayama, S. Inubushi, R. Sasaki, M. Yashiro, T. Takeuchi, A Pretreatment-Free, Polymer-Based Platform Prepared by Molecular Imprinting and Post-Imprinting Modifications for Sensing Intact Exosomes, *Angew Chem Int Ed Engl*. 58 (6) (2019) 1612-1615, https://doi.org/10.1002/anie.201811142.

[12] Y. Han, X. Li, Y. Zhang, Y. Han, F. Chang, J. Ding, Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine, Cells. 8 (8) (2019), https://doi.org/10.3390/cells8080886.

[13] S. Fernández-Francos, N. Eiro, L.A. Costa, S. Escudero-Cernuda, M.L. Fernández-Sánchez, F.J. Vizoso, Mesenchymal Stem Cells as a Cornerstone in a Galaxy of Intercellular Signals: Basis for a New Era of Medicine, *Int J Mol Sci*. 22 (7) (2021), https://doi.org/10.3390/ijms22073576.

[14] A. Warnecke, N. Prenzler, J. Harre, U. Köhl, L. Gärtner, T. Lenarz, S. Laner-Plamberger, G. Wietzorrek, H. Staecker, T. Lassacher, J. Hollerweger, M. Gimona, E. Rohde, First-in-human intracochlear application of human stromal cell-derived extracellular vesicles, *J Extracell Vesicles*. 10 (8) (2021) e12094, https://doi.org/10.1002/jev2.12094.

[15] S. Takeuchi, A. Tsuchiya, T. Iwasawa, S. Nojiri, T. Watanabe, M. Ogawa, T. Yoshida, K. Fujiki, Y. Koui, T. Kido, Y. Yoshioka, M. Fujita, J. Kikuta, T. Itoh, M. Takamura, K. Shirahige, M. Ishii, T. Ochiya, A. Miyajima, S. Terai, Small extracellular vesicles derived from interferon-γ pre-conditioned mesenchymal stromal cells effectively treat liver fibrosis, *NPJ Regen Med*. 6 (1) (2021) 19, https://doi.org/10.1038/s41536-021-00132-4.

[16] X. Ma, M. Huang, M. Zheng, C. Dai, Q. Song, Q. Zhang, Q. Li, X. Gu, H. Chen, G. Jiang, Y. Yu, X. Liu, S. Li, G. Wang, H. Chen, L. Lu, X. Gao, ADSCs-derived extracellular vesicles alleviate neuronal damage, promote neurogenesis and rescue memory loss in mice with Alzheimer's disease, *J Control Release*. 327 (2020) 688-702, https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.019.

[17] N. Ridzuan, N. Zakaria, D. Widera, J. Sheard, M. Morimoto, H. Kiyokawa, S.A. Mohd Isa, G.K. Chatar Singh, K.Y. Then, G.C. Ooi, B.H. Yahaya, Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles ameliorate airway inflammation in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), *Stem Cell Res Ther*. 12 (1) (2021) 54, https://doi.org/10.1186/s13287-020-02088-6.

[18] E. Xiang, B. Han, Q. Zhang, W. Rao, Z. Wang, C. Chang, Y. Zhang, C. Tu, C. Li, D. Wu, Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells prevent the progression of early diabetic nephropathy through inhibiting inflammation and fibrosis, *Stem Cell Res Ther*. 11 (1) (2020) 336, https://doi.org/10.1186/s13287-020-01852-y.

[19] K. Tashiro, Y. Yoshioka, T. Ochiya, Extracellular vesicles from adipose-derived stem cells relieve extremity lymphedema in mouse models, *Plast Reconstr Surg* (2023), https://doi.org/10.1097/prs.0000000000010388.

[20] H. Hanai, D.A. Hart, G. Jacob, K. Shimomura, W. Ando, Y. Yoshioka, T. Ochiya, S. Nakagawa, M. Nakamura, S. Okada, N. Nakamura, Small extracellular vesicles derived from human adipose-derived mesenchymal stromal cells cultured in a new chemically-defined contaminate-free media exhibit enhanced biological and therapeutic effects on human chondrocytes *in vitro* and in a mouse osteoarthritis model, *J Extracell Vesicles*. 12 (7) (2023) e12337, https://doi.org/10.1002/jev2.12337.

[21] A. Terunuma, Y. Yoshioka, T. Sekine, T. Takane, Y. Shimizu, S. Narita, T. Ochiya, H. Terunuma, Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells of dental pulp and adipose tissue display distinct transcriptomic characteristics suggestive of potential therapeutic targets, *J Stem Cells Regen Med*. 17 (2) (2021) 56-60, https://doi.org/10.46582/jsrm.1702009.

[22] T. Kadota, Y. Fujita, J. Araya, N. Watanabe, S. Fujimoto, H. Kawamoto, S. Minagawa, H. Hara, T. Ohtsuka, Y. Yamamoto, K. Kuwano, T. Ochiya, Human bronchial epithelial cell-derived extracellular vesicle therapy for pulmonary fibrosis via inhibition of TGF-β-WNT crosstalk, *J Extracell Vesicles*. 10 (10) (2021) e12124, https://doi.org/10.1002/jev2.12124.

[23] S.C. Jang, K.D. Economides, R.J. Moniz, C.L. Sia, N. Lewis, C. McCoy, T. Zi, K. Zhang, R.A. Harrison, J. Lim, J. Dey, M. Grenley, K. Kirwin, N.L. Ross, R. Bourdeau, A. Villiger-Oberbek, S. Estes, K. Xu, J. Sanchez-Salazar, K. Dooley, W.K. Dahlberg, D.E. Williams, S. Sathyanarayanan, ExoSTING, an extracellular vesicle loaded with STING agonists, promotes tumor immune surveillance, *Commun Biol*. 4 (1) (2021) 497, https://doi.org/10.1038/s42003-021-02004-5.

[24] N.D. Lewis, C.L. Sia, K. Kirwin, S. Haupt, G. Mahimkar, T. Zi, K. Xu, K. Dooley, S.C. Jang, B. Choi, A. Boutin, A. Grube, C. McCoy, J. Sanchez-Salazar, M. Doherty, L. Gaidukov, S. Estes, K.D. Economides, D.E. Williams, S. Sathyanarayanan, Exosome Surface Display of IL12 Results in Tumor-Retained Pharmacology with Superior Potency and Limited Systemic Exposure Compared with Recombinant IL12, *Mol Cancer Ther*. 20 (3) (2021) 523-534, https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-20-0484.

[25] Y. Kiya, Y. Yoshioka, Y. Nagakawa, T. Ochiya, Extracellular Vesicles Are Important Mediators That Regulate Tumor Lymph Node Metastasis via the Immune System, *Int J Mol Sci*. 24 (2) (2023), https://doi.org/10.3390/ijms24021362.

[26] Y. Naito, Y. Yoshioka, T. Ochiya, Intercellular crosstalk between cancer cells and cancer-associated fibroblasts via extracellular vesicles, *Cancer Cell Int*. 22 (1) (2022) 367, https://doi.org/10.1186/s12935-022-02784-8.

[27] T. Tamura, Y. Yoshioka, S. Sakamoto, T. Ichikawa, T. Ochiya, Extracellular vesicles in bone homeostasis: key roles of physiological and pathological conditions, *J Bone Miner Metab*. 41 (3) (2023) 345-357, https://doi.org/10.1007/s00774-022-01362-2.

第 1 章　機能解析

Functional analysis

		商品
タンパク質抽出	連続的にエクソソーム精製およびエクソソームタンパク質抽出	
		DiagExo® 血清エクソソーマルタンパク質抽出キット ······· 8 ページ～
	精製済みエクソソームから界面活性剤を含まないトータルタンパク質抽出	
		エクソソームタンパク質抽出キット（界面活性剤フリー）···· 9 ページ～
RNA / タンパク質抽出	精製済みのエクソソームから RNA およびタンパク質を抽出	
		エクソソーム由来の RNA およびタンパク質抽出キット ····· 10 ページ～
RNA 抽出	エクソソーム（血漿／血清用）精製後に RNA 分離	
		血漿／血清エクソソーム精製 & RNA 分離キット ············· 11 ページ～
	エクソソーム（尿由来）精製後に RNA 分離	
		尿用 エクソソーム精製 & RNA 分離キット ··················· 12 ページ～
	エクソソーム（尿由来）から一気に RNA 精製	
		尿中のエクソソーム RNA 精製キット ························· 13 ページ～
	エクソソーム（細胞培養上清）精製後に RNA 分離	
		細胞培養上清用 エクソソーム精製 & RNA 分離キット ······· 15 ページ～
	精製済みのエクソソームから RNA 分離	
		エクソソーム RNA 分離キット ································· 16 ページ～
	サンプルから small RNA を単離	
		TraPR small RNA 単離キット ································· 17 ページ～
DNA 抽出	精製済みのエクソソームから DNA 分離	
		エクソソーム由来の DNA 抽出キット ························· 19 ページ～
遺伝子操作	miRNA 導入	ExoFectin® sRNA-into-Exosome Kit（Electro）··········· 20 ページ～
	miRNA 阻害核酸	CL-AMO　miRNA 阻害核酸 ······································ 21 ページ～
	ターゲット検出	miRNAscope™ miRNA *in situ* hybridization ·············· 23 ページ～
	miRNA の cDNA 増幅	microScript microRNA cDNA 合成キット ·················· 25 ページ～
	ライブラリ調製	Small RNA-Seq Library Prep Kit ······························ 26 ページ～
観察	超解像光学顕微鏡用	ExoBrite™ STORM EV Membrane Staining Kits ········ 27 ページ～
	エクソソームの膜染色	脂質膜染色蛍光色素 CellBrite® Steady ······················ 28 ページ～
	透過型電子顕微鏡用	Exosome-TEM-easy キット ····································· 30 ページ～

DiagExo® 血清エクソソーマルタンパク質抽出キット

101Bio

微量サンプルから高収率で回収・分離

ヒトの血清、血漿、母乳、唾液、腹膜流体、脳脊髄液（CSF）、胃腸液（GI）、羊水から、エクソソーム由来のタンパク質を単離するためのキットです。わずか 100 µL のサンプルから効率的にタンパク質を抽出します。

特長

●高純度なエクソソームを回収
●超遠心分離法に比べて高い収率（約 10 倍）
●煩雑な単離操作は不要（操作時間は 2 時間以内）
●抗体ビーズ法よりも低コスト
●回収したエクソソーム由来のタンパク質は各種アプリケーションに適用可能（ELISA、タンパク質質量分析、タンパク質バイオマーカー検証、ゲル分析など）

エクソソームの単離とタンパク質抽出

プロトコール

0.1 ～ 0.5 mL 血清サンプルの例

❶ サンプルの準備：
血清サンプル 0.1 ～ 0.5 mL を採取し、氷上で冷却する。
凍結サンプルを使用する場合は、サンプルを室温で完全に解凍してから氷上で冷却する。

❷ 4℃、3,000 × *g* で 15 分間遠心分離し、細胞と残渣を除去する。
重要：このステップを省くと、ステップ 15 でフィルターが詰まる可能性がある。

❸ ペレットに触れないよう、澄明な上清 0.1 ～ 0.5 mL を 15 mL 遠心チューブに移す。
上清にサンプルバッファーを加え、トータルで 2 mL になるように希釈し、氷上で冷却する。
（その他の体液（サンプル量 0.1 ～ 1 mL）を使用する場合も、同様に希釈する。）
重要：サンプル量が 1 mL を超える場合は、同量のサンプルバッファーを加え、氷上で冷却する。例えば、唾液 1.2 mL は、サンプルバッファー 1.2 mL で希釈する。（サンプル量が 1 ～ 2 mL の場合は、同様に希釈する。）

❹ 別の 1.5 mL 遠心チューブに、下記の順に溶液 A / B / C を加え、混合液 0.9 mL を調製する。
（溶液 A / B / C 混合液は使用直前に調製する）
（1）溶液 A を添加：0.3 mL
（2）溶液 B を添加：0.3 mL
（3）溶液 C を添加：0.3 mL

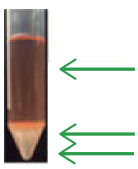
❺ 溶液 A / B / C 混合液を 10 秒間ボルテックスし、均一な溶液にする。

❻ 溶液 A / B / C 混合液 0.9 mL を、希釈した血清サンプル 2 mL（ステップ❸で調製したもの）に加える。

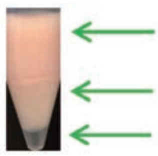
❼ 15 mL チューブのキャップをしっかりと閉め、チューブを静かに 10 回以上反転させよく混ぜ、4℃で 30 分間インキュベートする。

❽ チューブを 5,000 × *g* で 3 分間遠心させる。

❾ a. 混合液は 3 層に分かれる。❿に進む。

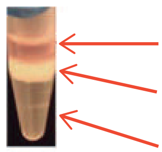


b. サンプルによっては層の分離がはっきりせず、写真のような 3 層になる場合がある。

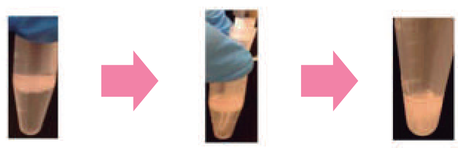


中間層にエクソソームが含まれるため、中間層に触れないよう、上層を取り除く。
別途、溶液 A / B / C 混合液 0.9 mL（❹❺を参照）を調製し、中間層と下層が含まれるチューブに加える。
チューブを静かに 10 回以上反転させよく混ぜ、4℃で 30 分間インキュベートする。5,000 × *g* で 3 分遠心し、❾ a のような三層になったら、❿に進む。

❿ 中間層に触れないよう、上層を取り除く。中間層を 1.5 mL 遠心チューブに移し、5,000 × *g* で 3 分遠心する。新たに 3 層に分かれる。



⓫ 上層を取り除く。ピペットのチップを下層に挿入し、無色の下層も完全に除去する。中間層だけをチューブに残す。エクソソームはこの層に含まれる。



上層を吸引する　　下層を除去する　　中間の fluff 層だけを残す

⓬ 再度 5,000 × *g* で 3 分遠心すると、再び 3 層になる。⓫をもう一度行う。fluff ペレットだけがチューブに残る。

⓭ チューブの蓋を開け、室温で 5 ～ 10 分風乾する（乾燥させすぎない）。

⓮ fluff ペレットに対し 4 倍量の 1 × PBS を加える。40 回強くピペッティングをし、fluff ペレットを再懸濁する。

⑮ 水平シェーカーで高速で3分攪拌した後、10回強くピペッティングをする。シェーカーで攪拌→ピペッティングをさらに2回繰り返す。
重要：fluff ペレットをよく再懸濁させないと、エクソソームの中に fluff ペレットが捕捉され、エクソソームの純度や回収量が低くなる場合がある。高脂血症患者サンプルなど、fluff ペレットからエクソソームを放出されることが難しい場合は、このステップでピペッティングと攪拌時間を延長する。

⑯ 5,000 × *g* で5分遠心し、fluff ペレットに触れないよう上清を DiagExo® カラムに移す。
重要：fluff ペレットは4℃で保管する。

⑰ DiagExo® カラムを 3,000 × *g* で5分間遠心し、フロースルー画分を回収する。**このフロースルー画分が、単離されたエクソソームとなる。**

⑱ DiagExo® 溶解バッファーを解凍する。単離されたエクソソームの量を確認し、単離されたエクソソームと等量の溶解バッファーを加える。5回ピペッティングし、均一な溶液にした後、氷上で15分間インキュベートする。

⑲ 4℃、14,000 × *g* で10分遠心する。**この上清が抽出されたエクソソーム由来タンパク質となる。**新しいチューブに移し、すぐにタンパク質アッセイに使用するか、−80℃で保存する。

［101 Bio, LLC　メーカー略号：OBL］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
DiagExo® Serum Exosomal Protein Extraction kit, Trial size	P300S	2 rxns	¥51,000	室凍
DiagExo® Serum Exosomal Protein Extraction kit	P300	10 rxns	¥142,000	室凍

タンパク質 /RNA/DNA 抽出 ▶▶▶ エクソソームタンパク質抽出　WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 17672

エクソソームタンパク質抽出キット（界面活性剤フリー）

101 Bio

抽出後のタンパク質は界面活性剤を含みません

精製したエクソソームから、界面活性剤を含まないトータルタンパク質を抽出できるキットです。タンパク質抽出バッファーは界面活性剤や EDTA を含みません。抽出したタンパク質は、プロテオーム解析（LC / MS）、免疫沈降（IP）、ELISA、二次元電気泳動、等電点電気泳動、SDS-PAGE、イムノブロットなどにご使用いただけます。

10反応分のキットで、1回の反応で、10～50 µL の精製エクソソームから、150～200 µg のエクソソーム由来タンパク質を抽出できます。

構成内容

- Buffer A
- Buffer B

プロトコール

① タンパク質を抽出する前に、バッファーおよびマイクロ遠心チューブを氷上であらかじめ冷却する。

② 101 Bio 社の PureExo® エクソソーム単離キット（55ページ参照）を用いて、エクソソームを単離する。

③ エクソソーム懸濁液に適切な量のバッファーAを加え（下表）、10～20秒ボルテックスしてエクソソームを溶解する。等量のバッファーBをチューブに加え、軽くボルテックスしてよく混合する。

エクソソーム量（µL）	バッファーA（µL）	バッファーB（µL）
5	5	5
10	10	10
20	20	20
30	30	30
40	40	40
50	50	50

表　エクソソームの量に対するバッファーの量

④ エクソソーム溶解液をあらかじめ冷却したマイクロ遠心チューブに移し、マイクロ遠心機で10分間トップスピードで遠心する（14,000～16,000 rpm）。

⑤ フロースルーの上清（界面活性剤を含まないタンパク質抽出物）をあらかじめ冷却した清浄なマイクロ遠心チューブに移し、氷上に保つ。タンパク質の濃度を測定する。得られたサンプルはそのままアッセイに使用するか、−80℃で3ヵ月間保存可能。

［101 Bio, LLC　メーカー略号：OBL］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Detergent-free Exosomal Protein Extraction Kit	P201	10 rxns	¥103,000	冷

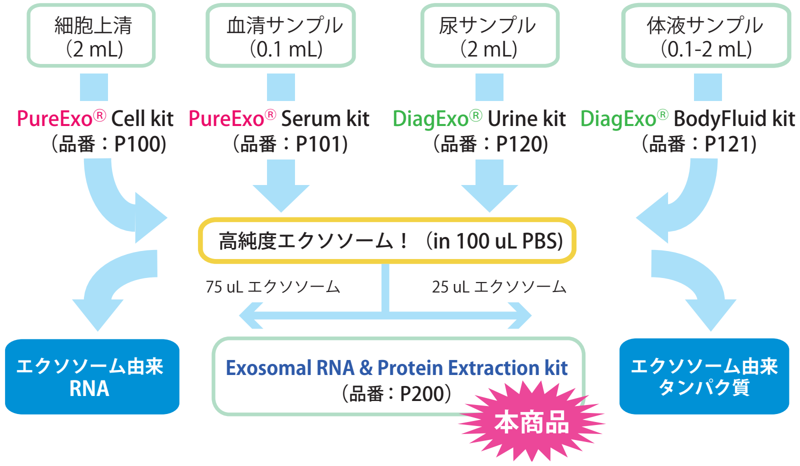
エクソソーム由来の RNA およびタンパク質抽出キット

101 Bio

エクソソーム中の RNA およびタンパク質を抽出

各種エクソソーム単離キット（品番：P100、P101、P120、P121）で単離した高純度エクソソームから、エクソソーマル RNA およびエクソソーマルタンパク質の両方を抽出するためのキットです。

●PureExo® エクソソーム精製キット
（品番：P100、P101）：55 ページでご紹介
●DiagExo® エクソソーム精製キット
（品番：P120、P121）：60 ページでご紹介



構成内容

●エクソソーマルタンパク質溶解バッファー
●N1、N2、N3、N4 溶液
●RNA 溶出バッファー

プロトコール

① サンプル調製

❶ 単離したエクソソームを RNase フリーチューブに移す。1 × PBS を加え、100 μL とする。

❷ RNA とタンパク質の両方の抽出が必要な場合は、エクソソームサンプルを 2 つに分ける：75 μL を RNA 抽出、25 μL をタンパク質抽出。

② エクソソーマル RNA の抽出

❸ エクソソームサンプル 75 μL を RNase フリーチューブに移し、N1 溶液 250 μL を加える。ピペットで上下させて混合し、室温で 5 分間インキュベートさせる。
＊ エクソソームサンプル量が異なる場合は、N1 溶液の容量をサンプル量に比例して調節する。

❹ N2 溶液 50 μL をサンプルに加え、15 秒間強くボルテックスし、室温で 2 ～ 3 分間インキュベートする。

❺ 12,000 *g*、4℃で 15 分間遠心する。

❻ 境界面を乱さないように、上層（水層）を吸引し、新しい RNase フリーチューブに移す。

❼ ❻のチューブに N3 溶液 125 μL を加え、エクソソーマル RNA を沈殿させる。

❽ 室温で 15 分間インキュベートし、12,000 *g*、4℃で 10 分間遠心する。

❾ エクソソーマル RNA のペレットは、チューブの底または側部でゲルを形成する。上清を注意深く吸引し、除去する。

❿ RNA ペレットに N4 溶液 250 μL を加えて混合し、7,500 *g*、4℃で 5 分間遠心する。RNA ペレットに触れないように、上清を除去する。

⓫ ステップ 10 を繰り返す。

⓬ RNA ペレットを室温で 10 分間風乾させる。

⓭ RNA ペレットを RNA 溶出バッファー 10 ～ 15 μL に溶解させる。そのままアッセイに用いるか、－80℃で最大 6 ヵ月間保存できる。

③ エクソソーマルタンパク質の抽出

⓮ エクソソームサンプル 25 μL を 1.5 mL チューブに移す。

⓯ エクソソーマルタンパク質溶解バッファーを室温で解凍し、氷上に置く。

⓰ エクソソームサンプル 25 μL にエクソソームタンパク質溶解バッファー 50 μL を加え、ピペットで上下させて混合させる。

⓱ 4℃で 15 分間インキュベートし、14,000 *g*、4℃で 10 分間遠心する。

⓲ この上清が抽出したエクソソーマルタンパク質である。上清を新しいチューブに移し、氷上に置く。タンパク質濃度を測定し、そのままアッセイに用いるか、－80℃で最大 3 ヵ月間保存できる。

［101 Bio, LLC　　メーカー略号：OBL］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Exosomal RNA and Protein Extraction kit	P200	20 prep.	¥172,000	室凍

血漿／血清エクソソーム精製 & RNA 分離キット

NORGEN BIOTEK CORP.

microRNA を含む全サイズのエクソソーム RNA を単離、濃縮

血清または血漿サンプルからエクソソームの精製および精製したエクソソーム由来の RNA 単離を連続的に行えます。

本キットは、Norgen 社独自のスピンカラムクロマトグラフィーを用いて、全てのサイズのエクソソームまたは細胞外小胞由来の RNA（microRNA を含む）を精製することができます。他社のキットとは異なり、特別な装置や沈殿試薬、フェノール／クロロホルム抽出やプロテアーゼ処理の必要がありません。また、使用目的に合わせて溶出量を調製することができます（50 ～ 100 µL）。精製したエクソソーム RNA は、qPCR、RT-PCR、ノーザンブロット法、RNase プロテクションアッセイ、プライマー伸長法、発現アレイなどにご使用いただけます。

特長

- 血漿または血清サンプルから機能解析のための**インタクトなエクソソームを精製・濃縮**
- 様々な量の血漿・血清サンプルに対応
- microRNA を含む全サイズのエクソソーム／細胞外小胞由来の RNA を分離
- サイズや GC 含有量に関わらず全ての RNA を結合・溶出
- フェノール抽出不要、プロテイナーゼ K 処理不要、キャリア RNA 不要
- 時間を要する超遠心分離、ろ過、特別なシリンジは不要
- オーバーナイトインキュベーションは不要
- RNA 結合タンパク質を含まない、純粋なエクソソームを精製
- 沈殿試薬のコンタミネーションなし

使用例

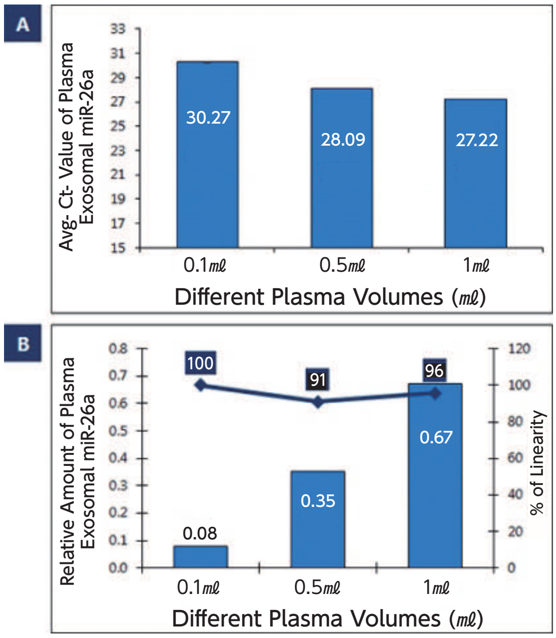


図 1　異なる量の血漿サンプルを用いたエクソソーム RNA の精製
Mini キット（品番：58300）を用いて、エクソソームを分離後、RNA を精製した。
精製した RNA 2µL を RT-qPCR のテンプレートとして使用し、血漿エクソソーム由来の miR-26a の増幅を評価した。
(A) miR-26a の平均 Ct 値は、どちらもサンプル量の増加に応じて直線的に低下した。
(B) 血漿エクソソーム由来の miR-26a の相対量は、90% 以上の回収率を示し、サンプル量の増加に応じて直線的に増加した。

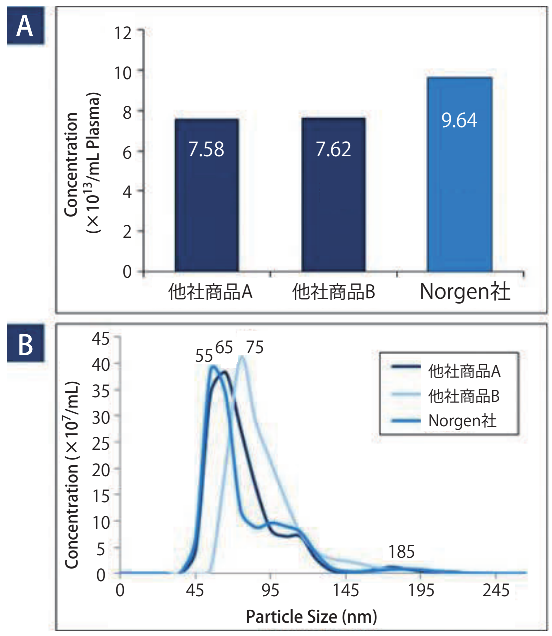


図 2　異なる手法を用いて、1 mL の血漿サンプルからエクソソームを精製した。
Mini キット（品番：58300）、他社商品 A および他社商品 B を使用して、エクソソームを単離後、NanoSight® LM10 で濃度（A）、粒径（B）を解析した。その結果、他社商品よりも高い収量（9.64 × 10^{13} particles/mL）で、純粋なエクソソーム（粒径：50 ～ 150 nm）を得ることができた。

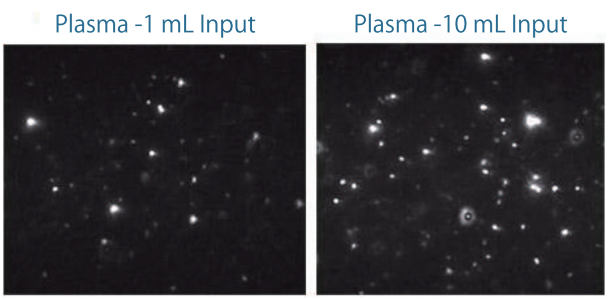


図 3　Mini キット（品番：58300）を用いて、1 mL または 10 mL の血漿サンプルから精製したエクソソーム

仕様

仕様	Mini キット 品番：58300	Midi キット 品番：58500	Maxi キット 品番：58600
サンプルの種類	血漿／血清		
サンプル量	50 µL ～ 1 mL	1 ～ 4 mL	4 ～ 10 mL
精製エクソソームの粒径	40 ～ 150 nm		
精製できる RNA のサイズ	全てのサイズ miRNA および small RNA（< 200 nt）を含む		
溶出量	50 ～ 100 µL		
10 回の精製にかかる時間	35 ～ 40 分		
平均的な収量	サンプル量により異なる		

[Norgen Biotek Corp.　メーカー略号：NOG]

品名／構成内容	サンプル量	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Plasma/Serum Exosome Purification and RNA Isolation Mini Kit	50 µL ～ 1 mL	58300	50 prep.	¥240,000	室
Plasma/Serum Exosome Purification and RNA Isolation Midi Kit	1 ～ 4 mL	58500	25 prep.	¥219,000	室
Plasma/Serum Exosome Purification and RNA Isolation Maxi Kit	4 ～ 10 mL	58600	15 prep.	¥131,000	室

【共通構成内容】 ●Slurry E　●ExoC バッファー　●ExoR バッファー　●溶解バッファー A　●溶解添加剤 B　●洗浄溶液 A　●溶出溶液 A　●Mini フィルタースピンカラム　●Mini スピンカラム　●コレクションチューブ　●溶出チューブ（1.7 mL）

尿用 エクソソーム精製 & RNA 分離キット

NORGEN BIOTEK CORP.

miRNA を含む全サイズのエクソソーム RNA を単離、濃縮

尿用 エクソソーム精製 & RNA 分離キットは、尿サンプルからエクソソームの精製および精製したエクソソーム由来の RNA 単離を連続的に行えるオールインワンシステムです。

本キットは、Norgen 社独自のスピンカラムクロマトグラフィーを用いて、全てのサイズのエクソソームまたは細胞外小胞（extracellular vesicles：EVs）由来の RNA（miRNA を含む）を精製することができます。他社のキットとは異なり、特別な装置や沈殿試薬、フェノール／クロロホルム抽出やプロテアーゼ処理は必要ありません。また、使用目的に合わせて溶出量を調整することができます（50 ～ 100 µL)。精製したエクソソーム RNA は、PCR、qPCR、RT-PCR、ノーザンブロット法、RNase プロテクションアッセイ、プライマー伸長法、発現アレイなどにご使用いただけます。

仕様

仕様	Mini キット 品番：58400	Midi キット 品番：58700	Maxi キット 品番：58800
サンプルの種類	尿		
サンプル量	250 µL ～ 1 mL	2 ～ 10 mL	11 ～ 30 mL
精製エクソソームの粒径	40 ～ 150 nm		
精製できる RNA のサイズ	全てのサイズ miRNA および small RNA（< 200 nt）を含む		
溶出量	50 ～ 100 µL		
10 回の精製にかかる時間	35 ～ 40 分		
平均的な収量	サンプル量により異なる		

特長

- ●尿サンプルから機能解析のための無傷なエクソソームを精製・濃縮
- ●様々な量の尿サンプルに対応
  （Mini キット：250 µL ～ 1 mL、Midi キット：2 ～ 10 mL、
  Maxi キット：11 ～ 30 mL）
- ●miRNA を含む全サイズのエクソソーム／細胞外小胞由来の RNA を分離
- ●サイズや GC 含有量に関わらず全ての RNA を結合・溶出
- ●フェノール抽出不要、プロテイナーゼ K 処理不要、キャリア RNA 不要
- ●時間を要する超遠心分離、ろ過、特別なシリンジは不要
- ●オーバーナイトインキュベーション不要
- ●RNA 結合タンパク質を含まない、高純度なエクソソームを精製
- ●沈殿試薬のコンタミネーションなし

構成内容

- ●Slurry E
- ●ExoC バッファー
- ●ExoR バッファー
- ●溶解バッファー A
- ●溶解添加剤 B
- ●洗浄溶液 A
- ●溶出溶液 A
- ●Mini フィルタースピンカラム
- ●Mini スピンカラム
- ●コレクションチューブ
- ●溶出チューブ（1.7 mL）

使用例

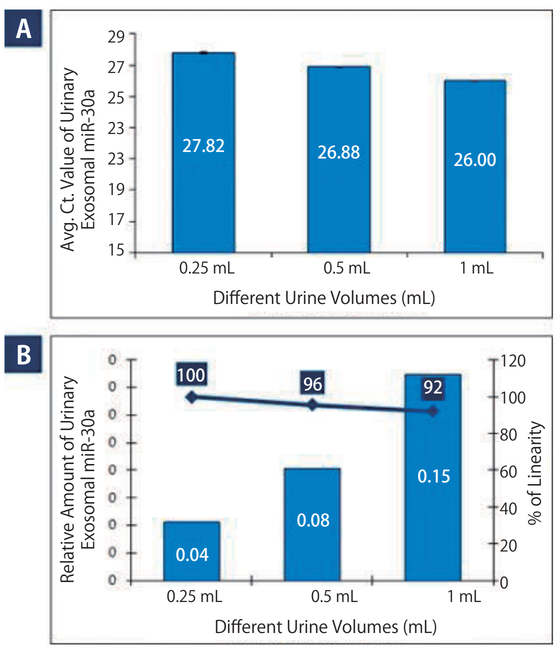


図 1　異なる量の尿サンプルを用いたエクソソーム RNA の精製
Mini キット（品番：58400）を用いて、エクソソームを分離後、RNA を精製した。
精製した RNA 2 µL を RT-qPCR のテンプレートとして使用し、尿エクソソーム由来の miR-30a の増幅を評価した。
（A）miR-30a の平均 Ct 値は、どちらもサンプル量の増加に応じて直線的に低下した。
（B）尿エクソソーム由来の miR-30a の相対量は、90% 以上の回収率を示し、サンプル量の増加に応じて直線的に増加した。

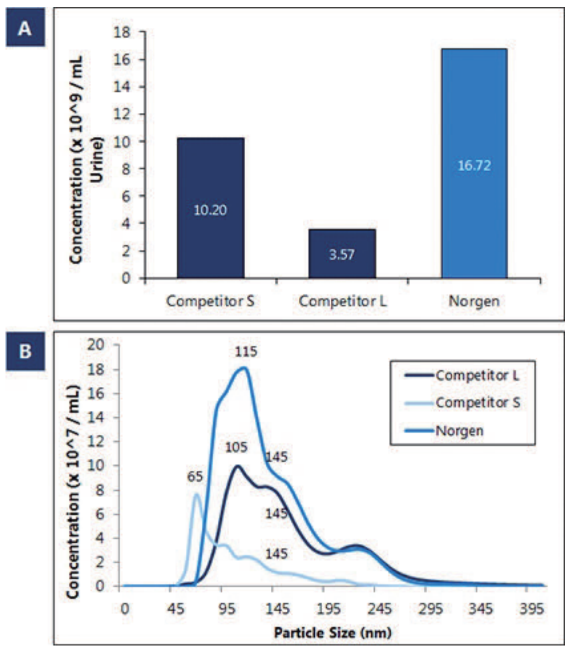


図 2　異なる手法による 5 mL の尿サンプルからのエクソソーム精製比較
Midi キット（品番：58700）、S 社商品および L 社商品を使用して、エクソソームを単離後、NanoSight® LM10 で粒径と濃度を解析した。その結果、他社商品よりも高い収量（8.36 × 10^9 particles/mL）で、高純度なエクソソーム（粒径：75 ～ 250 nm）を得ることができた。

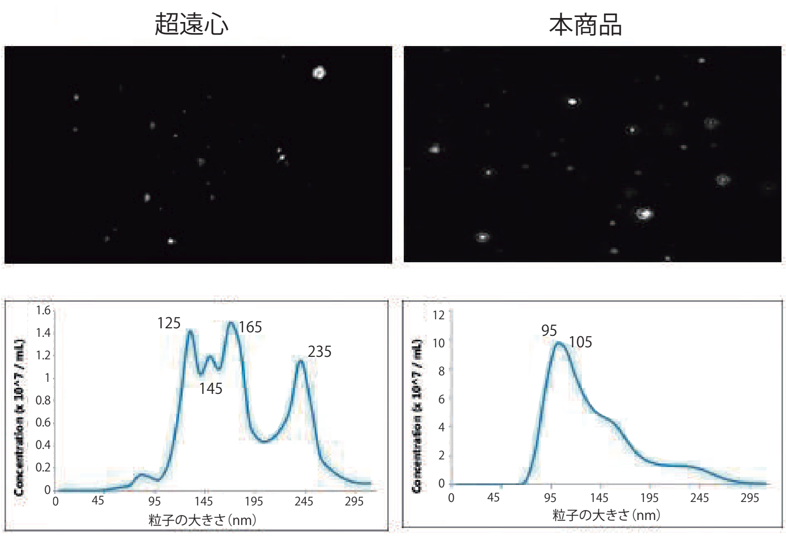


図 3　Midi キット（品番：58700）または超遠心分離法を用いて、10 mL の尿サンプルから精製したエクソソーム

［Norgen Biotek Corp.　　メーカー略号：NOG］

品名	対応サンプル量	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Urine Exosome Purification and RNA Isolation Mini Kit	250 µL ～ 1 mL	58400	50 preps	￥302,000	室
Urine Exosome Purification and RNA Isolation Midi Kit	2 ～ 10 mL	58700	25 preps	￥286,000	室
Urine Exosome Purification and RNA Isolation Maxi Kit	11 ～ 30 mL	58800	15 preps	￥172,000	室

タンパク質 /RNA/DNA 抽出 ▸▸▸ エクソソーム RNA 抽出　　WEB 記事 ID 検索 ▸▸▸ 9234

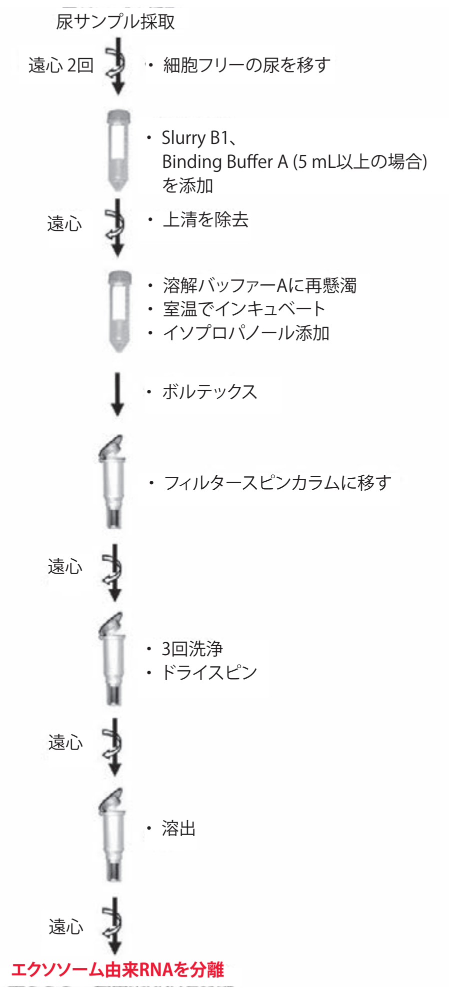
尿中のエクソソーム RNA 精製キット

NORGEN BIOTEK CORP.

スピンカラムで簡単に分離・抽出

Norgen 社の尿中エクソソーム RNA 単離キットは、尿サンプルからエクソソーム RNA を単離、濃縮するオールインワンシステムです。Norgen 社独自の樹脂を基盤としたスピンカラムにより精製します。本キットは尿サンプル（50 検体）からエクソソーム RNA を単離できるよう設計されています。また 1 ～ 10 mL の尿サンプルからエクソソーム RNA を単離することができます。

エクソソーム RNA は阻害物質を含まずに単離できるため、様々なダウンストリームアッセイに鋳型として用いることができます。



特長

- **●迅速で簡便なプロトコール**
  迅速なスピンカラム法により、複数サンプルを 30 分以内に処理
- **●幅広い尿量に対応**
  1 ～ 10 mL の尿サンプルからエクソソーム RNA を抽出
- **●フェノール／クロロホルム抽出不要**
  フェノールやクロロホルム等、有毒な化学物質を用いずにエクソソーム RNA を抽出可能
- **●高純度**
  精製した RNA は、RT-PCR 法、ノーザンブロット法、マイクロアレイ等、遺伝子制御や機能解析実験に利用可能

ダウンストリームアッセイ例

●バイオアナライザー
●リアルタイム PCR 法による定量
●RT-PCR 法
●ノーザンブロット法
●RNase プロテクション法
●プライマー伸長法
●発現アレイ
●次世代シーケンシング
●RNA クローニング

構成内容

●Slurry B1
●結合バッファー A
●溶解バッファー A
●洗浄液 A
●溶出液 A
●ミニフィルタースピンカラム
●回収チューブ
●溶出チューブ（1.7 mL）
●Product Insert

機能解析　タンパク質 / RNA/DNA 抽出　遺伝子操作　観察　基礎（調製・検出）　EVs・EVs 産生　EVs 精製　エクソソーム マーカー抗体　ELISA　FC/FCCS　リキッドバイオプシー　cf-DNA/ cf-RNA 精製　その他　受託サービス

商品データ

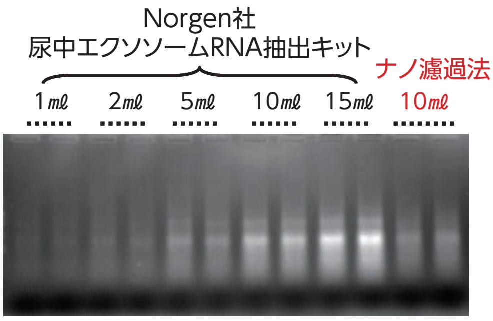


図 1　尿のエクソソーム由来 RNA 抽出
本キットを用いて、1 ～ 15 mL の尿からエクソソーム RNA を抽出し、RNA の収量を従来のナノろ過法と比較した。本キットは、処理した尿量に応じて RNA の収量も直線的に増加した。また、本キットと従来のナノろ過法で 10 mL の尿から抽出した場合では、本キットの方が高収量であった。

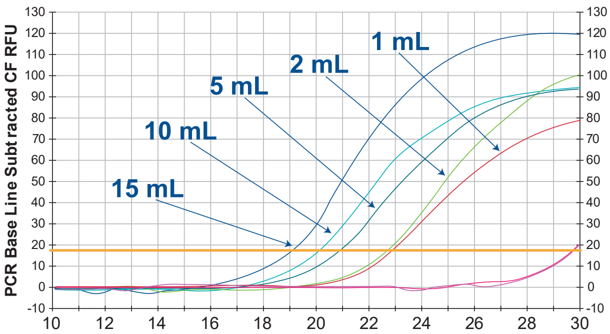


図 2　各尿量から抽出したエクソソーム RNA 量の測定
本キットを用いて、1 ～ 15 mL の尿量からエクソソーム RNA を抽出した。抽出した尿中エクソソーム RNA を RT-qPCR の鋳型とし、ヒト 5S 遺伝子を測定した。3 µL の単離した尿中エクソソーム RNA を RT の鋳型とし、cDNA の 3 µL を qPCR に供した。確認できるよう、各尿量から単離した RNA で qPCR での検出と増幅が行えたため、単離した尿中エクソソーム RNA は高品質であるといえる。

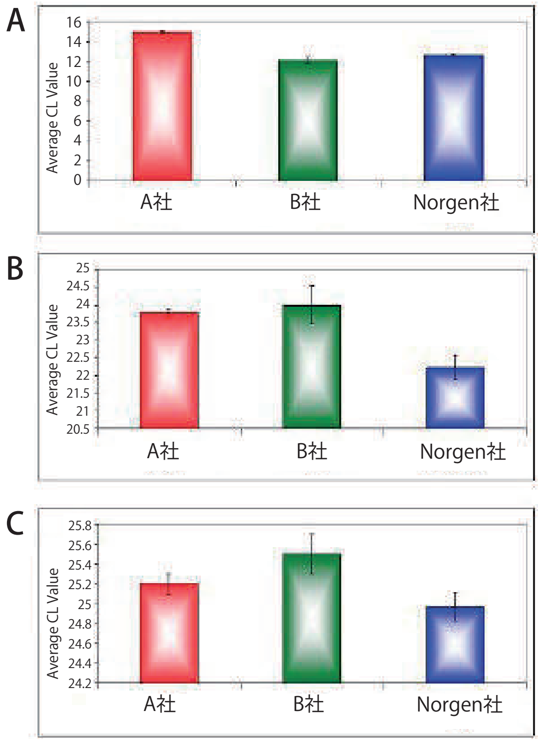


図 3　尿中エクソソーム RNA を効果的かつ確実に検出
本キット（青）と他社製キット 2 種類（緑、赤）を用いて、細胞を除いた 5 mL のヒト尿からエクソソーム RNA を抽出した。miR-21、miR-16 のステムループと、ハウスキーピング遺伝子として 5S rRNA を RT-qPCR で測定した。まず、100 µL の単離 RNA 溶液から 3 µL を、5S rRNA、miR-21、miR-16 の各リバースプライマーを用いた反応系 20 µL の逆転写反応に供した。cDNA の 3 µL を、反応系 20 µL の各遺伝子のリアルタイム PCR 反応に用いた。本キットは唯一、確認したすべての転写産物を品質よく確実に検出した。

［Norgen Biotek Corp.　　メーカー略号：NOG］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Urine Exosome RNA Isolation Kit	47200	50 preps	¥164,000	室

細胞培養上清用 エクソソーム精製 & RNA 分離キット

NORGEN BIOTEK CORP.

miRNA を含む全サイズのエクソソーム RNA を単離、濃縮

細胞培養上清用 エクソソーム精製 & RNA 分離キットは、細胞培養上清サンプルからエクソソームの精製および精製したエクソソーム由来の RNA 単離を連続的に行えるオールインワンシステムです。

本キットは、Norgen 社独自のスピンカラムクロマトグラフィーを用いて、全てのサイズのエクソソームまたは細胞外小胞（extracellular vesicles：EVs）由来の RNA（miRNA を含む）を精製することができます。他社のキットとは異なり、特別な装置や沈殿試薬、フェノール／クロロホルム抽出やプロテアーゼ処理は必要ありません。また、使用目的に合わせて溶出量を調整することができます（50 ～ 100 µL）。精製したエクソソーム RNA は、PCR、qPCR、RT-PCR、ノーザンブロット法、RNase プロテクションアッセイ、プライマー伸長法、発現アレイなどにご使用いただけます。

仕様

仕様	Mini キット 品番：60700	Midi キット 品番：60800	Maxi キット 品番：60900
サンプルの種類	細胞培養培地		
サンプル量	5 ～ 10 mL	10 ～ 20 mL	20 ～ 35 mL
精製エクソソームの粒径	40 ～ 150 nm		
精製できる RNA のサイズ	全てのサイズ miRNA および small RNA（< 200 nt）を含む		
溶出量	50 ～ 100 µL		
10 回の精製にかかる時間	35 ～ 40 分	40 ～ 45 分	
平均的な収量	サンプル量により異なる		

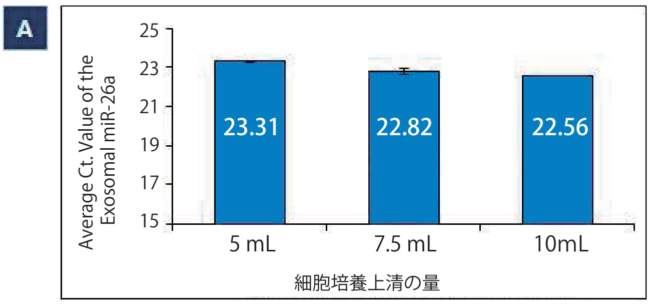
特長

- ●細胞培養上清から機能解析のためのインタクトなエクソソームを精製・濃縮
- ●様々な量の細胞培養上清サンプルに対応（Mini キット：5 ～ 10 mL、Midi キット：10 ～ 20 mL、Maxi キット：20 ～ 35 mL）
- ●miRNA を含む全サイズのエクソソーム／細胞外小胞由来の RNA を分離
- ●サイズや GC 含有量に関わらず全ての RNA を結合・溶出
- ●フェノール抽出不要、プロテイナーゼ K 処理不要、キャリア RNA 不要
- ●時間を要する超遠心分離、ろ過、特別なシリンジは不要
- ●オーバーナイトインキュベーション不要
- ●RNA 結合タンパク質を含まない、高度なエクソソームを精製
- ●沈殿試薬のコンタミネーションなし

構成内容（Mini キット）

- ●Slurry E
- ●ExoC バッファー
- ●ExoR バッファー
- ●溶解バッファー A
- ●溶解添加剤 B
- ●洗浄溶液 A
- ●溶出液 A
- ●ミニフィルターカラム
- ●ミニスピンカラム
- ●コレクションチューブ
- ●溶出チューブ（1.7 mL）

使用例



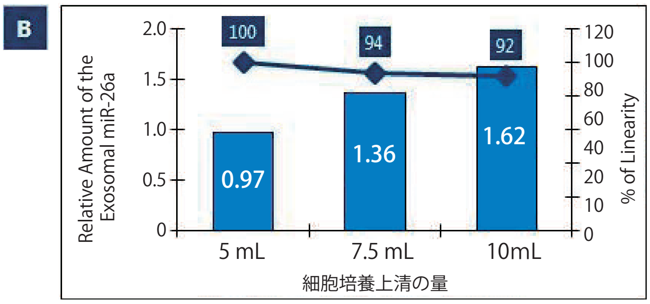


図　異なる量の細胞培養上清サンプルからエクソソーム RNA を精製
Mini キット（品番：60700）を用いて、エクソソームを分離後、RNA を精製した。精製した RNA 2 µL を RT-qPCR のテンプレートとして使用し、血漿エクソソーム由来の miR-26a の増幅を評価した。
(A) miR-26a の平均 Ct 値は、どちらもサンプル量の増加に応じて直線的に低下した。
(B) 血漿エクソソーム由来の miR-26a の相対量は、90% 以上の回収率を示し、サンプル量の増加に応じて直線的に増加した。

［Norgen Biotek Corp.　メーカー略号：NOG］

品名	対応サンプル量	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Cell Culture Media Exosome Purification and RNA Isolation Mini Kit	5 ～ 10 mL	60700	50 preps	¥234,000	室
Cell Culture Media Exosome Purification and RNA Isolation Midi Kit	10 ～ 20 mL	60800	25 preps	¥245,000	室
Cell Culture Media Exosome Purification and RNA Isolation Maxi Kit	20 ～ 35 mL	60900	15 preps	¥157,000	室

機能解析　タンパク質 / RNA/DNA 抽出　遺伝子操作　観察　基礎（調製・検出）　EVs・EVs 産生　EVs 精製　エクソソームマーカー抗体　ELISA　FC/FCCS　リキッドバイオプシー　cf-DNA/cf-RNA 精製　その他　受託サービス

タンパク質 /RNA/DNA 抽出 ▶▶▶ エクソソーム RNA 抽出　WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 16040

エクソソーム RNA 分離キット

NORGEN BIOTEK CORP.

精製済みのエクソソームサンプルから RNA を単離、濃縮

エクソソーム RNA 単離キットは、Norgen 社のエクソソーム精製キット（62 ページ参照）使用後のサンプルから、迅速にエクソソーム RNA を精製・濃縮できるキットです。また、分離した細胞外小胞（extracellular vesicles：EVs）サンプルの RNA 精製にもご使用いただけます。

本商品は、Norgen 社独自の樹脂を用いており、全てのサイズのエクソソームまたは EVs 由来の RNA（miRNA を含む）を精製することができます。他社のキットとは異なり、特別な装置や沈殿試薬、フェノール／クロロホルム抽出やプロテアーゼ処理の必要がありません。また、使用目的に合わせて溶出量を調整することができます（50 ～ 100 µL）。精製したエクソソーム RNA は、PCR、qPCR、RT-PCR、ノーザンブロット法、RNase プロテクションアッセイ、プライマー伸長法、発現アレイなどにご使用いただけます。

特長

●miRNA を含む全サイズのエクソソーム RNA ／細胞外小胞 RNA を分離
●サイズや GC 含有量に関わらず全ての RNA を結合・溶出
●フェノール抽出不要、プロテイナーゼ K 処理不要、キャリア RNA 不要
●単離した RNA を目的に合わせた量で溶出（50 ～ 100 µL）
●高品質の RNA を 35 ～ 45 分間で迅速に精製
●沈殿試薬のコンタミネーションなし

仕様

仕様	品番：58000
サンプルの種類	血清／血漿、細胞培養培地または尿から精製したエクソソーム（Norgen 社のエクソソーム精製キットを使用して抽出したサンプル）
精製できる RNA のサイズ	全てのサイズ miRNA および small RNA（< 200 nt）を含む
溶出量	50 ～ 100 µL
10 回の精製にかかる時間	35 ～ 40 分
平均的な収量	サンプルにより異なる

使用例

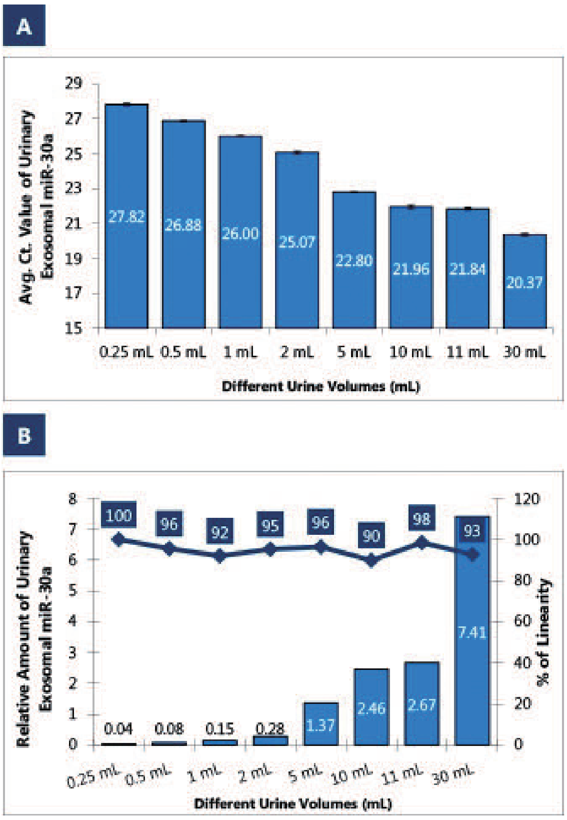


図 1　異なる量の尿サンプルから精製したエクソソームを用いて、RNA を分離
本キットを用いて、尿用 エクソソーム精製キット（62 ページ参照）で分離したエクソソームから RNA を精製した。
精製した RNA 2 µL を RT-qPCR のテンプレートとして使用し、尿エクソソーム由来の miR-30a の増幅を評価した。
（A）miR-30a の平均 Ct 値は、どちらもサンプル量の増加に応じて直線的に低下した。
（B）尿エクソソーム由来の miR-30a の相対量は、90% 以上の回収率を示し、サンプル量の増加に応じて直線的に増加した。

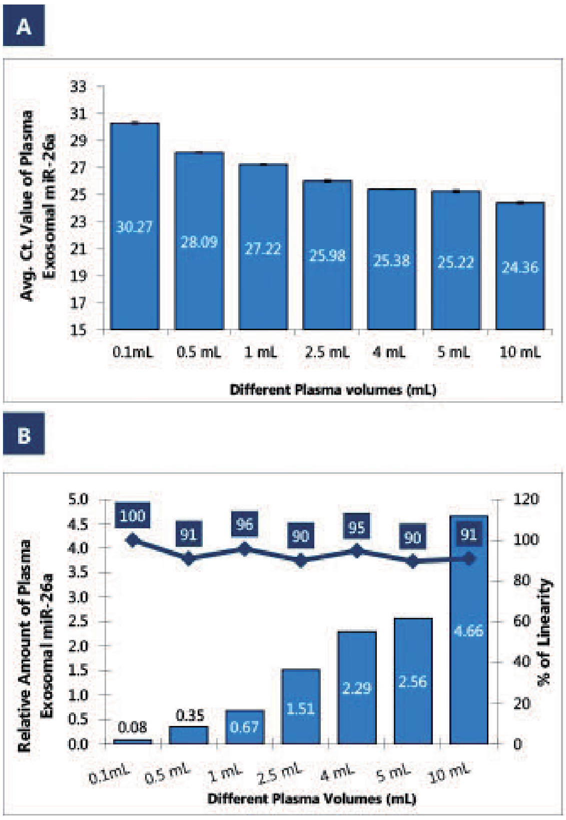


図 2　異なる量の血漿サンプルから精製したエクソソームを用いて、RNA を分離
本キットを用いて、血清／血漿用 エクソソーム精製キット（62 ページ参照）で分離したエクソソームから RNA を精製した。
精製した RNA 2 µL を RT-qPCR のテンプレートとして使用し、血漿エクソソーム由来の miR-26a の増幅を評価した。
（A）miR-26a の平均 Ct 値は、どちらもサンプル量の増加に応じて直線的に低下した。
（B）血漿エクソソーム由来の miR-26a の相対量は、90% 以上の回収率を示し、サンプル量の増加に応じて直線的に増加した。

［Norgen Biotek Corp.　　メーカー略号：NOG］

品名／構成内容	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Exosomal RNA Isolation Kit	58000	50 preps	¥94,000	室

●溶解バッファー A　●溶解添加剤 B　●洗浄溶液 A　●溶出溶液 A　●Mini フィルタースピンカラム 50 本　●コレクションチューブ 50 本
●溶出チューブ（1.7 mL）50 本

TraPR small RNA 単離キット

LEXOGEN The RNA Experts

精製エクソソームに使用できます

TraPR（Trans-kingdom, rapid, affordable Purification of RISCs）small RNA 単離キットは、機能性 small RNA を単離するキットです。カラムを用いて RISC（RNA-induced silencing complex；RNA 誘導サイレンシング複合体）と呼ばれるRNA- タンパク質複合体の画分を調製後、フェノール・クロロホルム法で small RNA を単離します。様々な生物種（真核生物）やサンプルタイプにご使用いただけます。

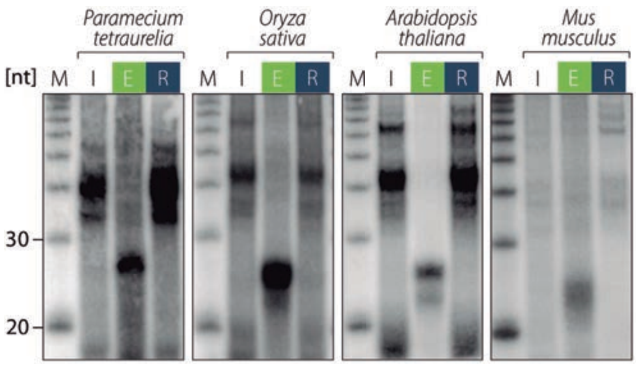


図 1 TraPR は様々な生物種で使用可能な TraPR small RNA 単離キットを用いて、繊毛虫、植物（イネ、シロイヌナズナ）、マウスから RISC 画分を調製し small RNA を単離した。組織より抽出した total RNA（I）、TraPR を用いて調製した small RNA（E）、TraPR カラムに保持された画分（R）について放射性同位体で標識し、ゲル電気泳動を行った。E のサンプルでは、20 ～ 30 nt 付近に small RNA のバンドが確認できた。（Grentzinger *et al*., 2020）

■ FAQ あります

コスモ・バイオのWeb に本商品のFAQ を掲載しています。

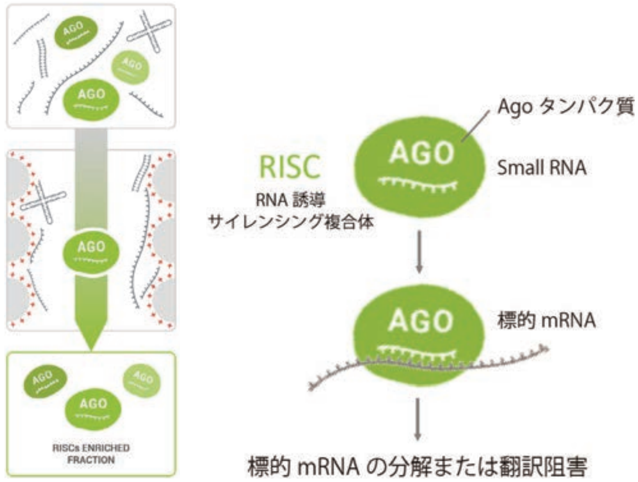
WEB 記事ID 44403 検索

特長

- ●生理的に重要な機能性 small RNA を単離
- ●カラムを用いた手法で操作は簡便
- ●様々な生物種（真核生物）やサンプルに使用可能
- ●再現性の高い結果が得られる
- ●単離した small RNA は RNA-seq などの実験に使用可能

原理

細胞または組織を溶解し、TraPR カラムにロードすると、遊離している RNA や DNA はカラムに保持され、small RNA や Ago タンパク質からなる RISC は溶出されます。この RISC 画分からフェノール／クロロホルム法により small RNA を単離します。得られた small RNA は、様々な分子生物学実験や次世代シーケンス解析に使用可能です。



従来の small RNA 単離法との比較

TraPR では、簡便なカラム精製（15 分）とそれに続く RNA 抽出（1 時間）により、機能性 small RNA を RISC から単離可能（図 2）で、時間のかかるゲル抽出や免疫沈降は不要です。本キットは生理的に重要な機能性 small RNA を短時間かつ簡便に効率よく抽出し、解析する画期的な方法です。次世代シーケンスに適した small RNA の調製が可能なため、従来の手法では解析が難しいとされていたサンプルからも再現性の高い結果が得られます（表）。

	TraPR	従来の Small RNA 単離法		
		Ago 免疫沈降法	Small RNA 抽出キット	ゲル抽出
特異性	✓	✓	✗	✓*
感度	✓	✓	✗	✗
再現性	✓	✓	✓	✗
汎用性	✓	✗	✓	✓
所要時間	✓	✗	✓	✗
簡便性	✓	✗	✓	✗

表　従来の small RNA 単離法との比較

＊Small RNAの長さについて特異性あり

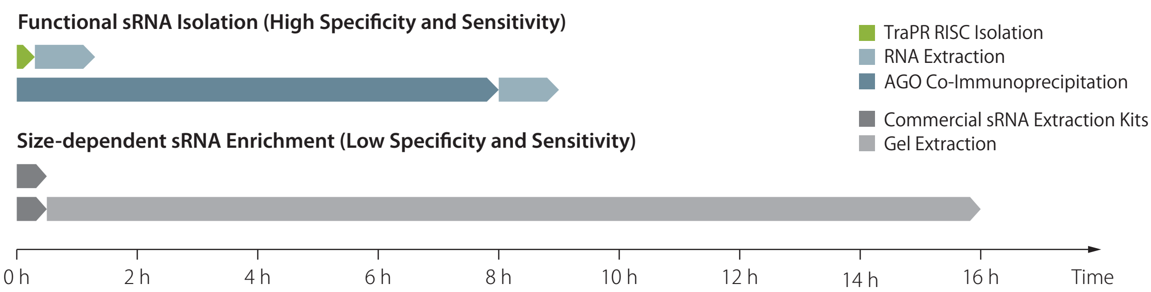


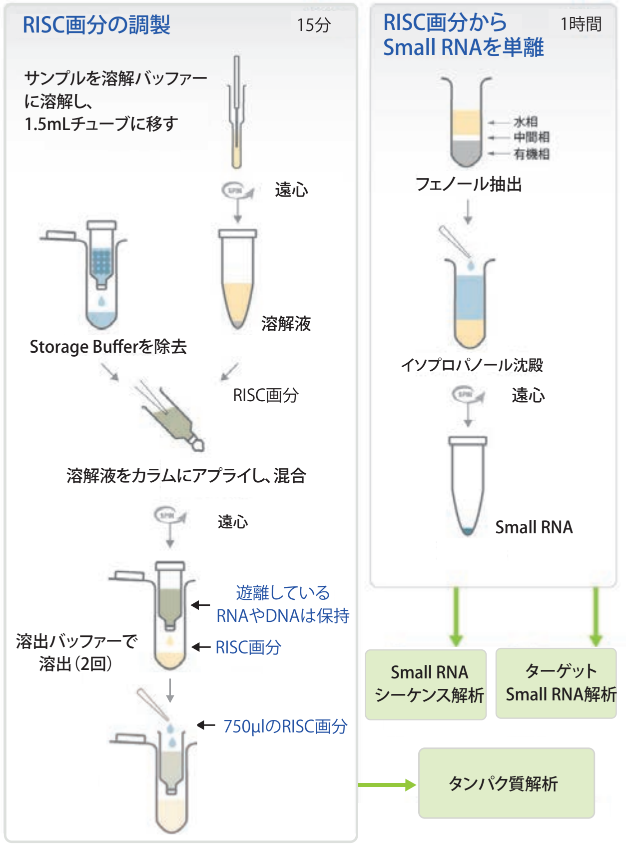
図 2　TraPR では small RNA の解析時間の削減が可能
TraPR では 1 時間 15 分で機能性 small RNA を単離可能。一般的な small RNA 抽出キットは非常に迅速だが特異性は望めない。ゲル抽出や免疫沈降では特異性は上がるものの、実験に 1 ～ 2 日要する。

次のページへ続く

機能解析
タンパク質/RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/cf-RNA 精製
その他
受託サービス

ワークフロー

TraPR カラムを用いて、細胞や組織の溶解液から RISC 画分を調製します。RISC 画分の調製に要する時間はわずか 15 分です。調製した RISC 画分から、フェノール・クロロホルム法を用いて small RNA を単離します。得られた small RNA は、次世代シーケンス解析等の様々な解析にご使用いただけます。



パフォーマンス

本商品では、piRNA、siRNA、miRNA を含む RISC-associated small RNA をカラムを用いて回収し、その後、機能性 small RNA のみ単離し、ライブラリ調製に用います（図 3）。このように、シーケンリードを機能性 small RNA に向けることで small RNA-Seq のコストを抑えることが可能です（図 4）。

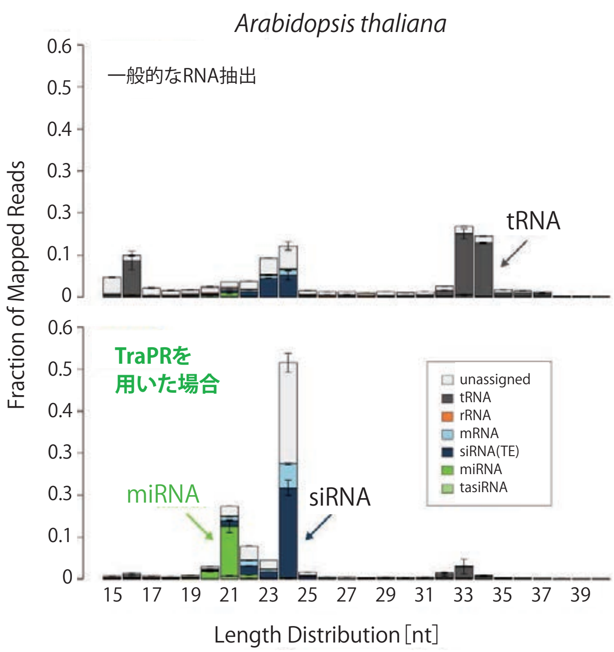


図 3　TraPR は機能性 small RNA を濃縮する
Arabidopsis thaliana について、従来の手法で調製した total RNA と TraPR を用いて単離した small RNA について、NGS ライブラリを調製しシケンス解析した。マップされたリードのサイズ分布および small RNA タイプを示す。

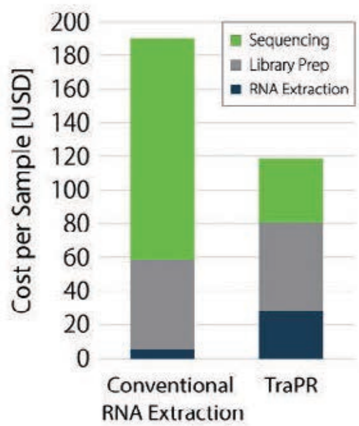


図 4　TraPR は small RNA の解析コストを削減できる
従来の抽出法で調製した RNA サンプルでは、機能的な small RNA にマップされるリードは総リードのうち約 40% だが、TraPR で単離した RNA サンプルでは、リードのほとんどが機能的な small RNA にマップされる（図 4 も参照）。1 レーンあたりより多くのライブラリをプールすることが可能で、その結果、サンプルあたりの全体的なコストが減少する。

［Lexogen GmbH　　メーカー略号：LEX］

品名／構成内容	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
TraPR small RNA Isolation Kit	128.08 128.24	8 prep. 24 prep.	¥79,000 ¥193,000	冷 冷

【構成内容】
●TraPR 溶解バッファー　●TraPR 溶出バッファー　●TraPR カラム　●Carrier Substance　●酢酸ナトリウム　●RNA 溶出バッファー
【お客様にてご用意いただく試薬】
●フェノール溶液 pH 4.3　●クロロホルム　●イソアミルアルコール　●イソプロパノール　●80% エタノール

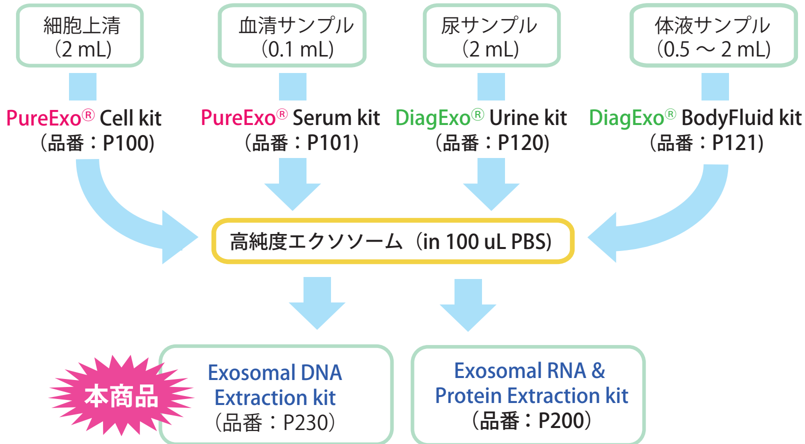
エクソソーム由来の DNA 抽出キット

101 Bio

血清／細胞培養上清由来エクソソームから DNA をスピンカラムで精製するキット

各種エクソソーム単離キット（品番：P100、P101、P120、P121、それぞれ 55、55、61、60 ページ参照）で単離した高純度エクソソームから、エクソソーム由来の DNA を抽出するキットです。

血清 200 μL または細胞培養上清 5 mL からエクソソームを単離した場合、本キットを用いて約 100 ～ 300 ng の DNA を回収することができます。



構成内容

- Buffer E1
- Buffer E2
- Buffer E3
- RNaseA
- PureExo® スピンカラム
- コレクションチューブ
- Buffer PN
- Buffer PS
- Buffer EB

プロトコール

1. 血清 200 μL または細胞培養上清 5 mL からエクソソームを単離する（品番：P100、P101、55 ページ参照）。
単離したエクソソームを PBS 100 μL で再懸濁する。
2. Buffer E1（RNase A 添加）250 μL をエクソソームサンプルに加え、ボルテックスまたはピペッティングで塊がなくなるまで混合する。
3. Buffer E2 250 μL を加え、4 ～ 6 回転倒混和する。その後室温で 4 ～ 5 分間静置すると粘性のある透明な溶液になる。
4. Buffer E3 350 μL を加え、4 ～ 6 回転倒混和する。
5. 室温で 5 分間静置後、10 分間遠心する。また、PureExo® スピンカラムをコレクションチューブに取り付ける。
6. 遠心後の上清を、ステップ 5 で用意したスピンカラムに移す。
7. 30 ～ 60 秒間遠心後、フロースルーを除去する。
8. Buffer PN 200 μL を加えて洗浄する。30 ～ 60 秒間遠心後、フロースルーを除去する。
9. Buffer PS 400 μL を加える。30 ～ 60 秒間遠心後、フロースルーを除去する。
10. スピンカラムをコレクションチューブに再度取り付け直し、さらに 2 分間遠心することで、残った洗浄バッファーを除去する。
11. 新しい 1.5 mL チューブにスピンカラムを移し、10 ～ 300 μL Buffer EB または精製水をカラム中央のフィルムに加える。室温で 2 分間静置し、1 分間遠心する。遠心後のフロースルーが精製後のエクソソーム由来 DNA である。

［101 Bio, LLC　　メーカー略号：OBL］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Exosomal DNA Extraction Kit	P230-25	25 rxns	¥103,000	室
	P230-50	50 rxns	¥178,000	室

ExoFectin® sRNA-into-Exosome Kit（Electro）

101 Bio

エクソソームに siRNA、miRNA を簡単導入

各種エクソソーム単離キット（品番：P100、P101、P120、P121、それぞれ 55、55、61、60 ページ参照）で単離した高純度エクソソームに、miRNA、siRNA などの small RNA を導入するためのキットです。

特長
●高いローディング効率
●エクソソームに対する影響は穏やか
●扱いやすい

構成内容
●ExoFectin® 溶液 A、B
●エレクトロポーレーションキュベット
●無菌ピペット

操作概要

❶ 高純度エクソソームを単離する（エクソソーム単離キット（品番：P100、P101、P120、P121 など）を使用）。単離したエクソソームがペレットの場合は、1 × PBS 10 ～ 100 µL に再懸濁する（エクソソームペレットの大きさに応じて、ペレットの 10 倍容量の PBS を加える）。エクソソーム懸濁液を氷上に置く。

❷ エクソソーム懸濁液 2 ～ 5 µL をとり、エクソソームタンパク質を定量する。トータルのエクソソームタンパク質濃度がエクソソームの定量値を示す。

❸ ExoFectin® 溶液 A 65 µL と ExoFectin® 溶液 B 35 µL を混合し、エクソソーム（10 ～ 100 µg）および small RNA（0.1 ～ 3 µmol）に加えて、ピペットで上下させて混合させる。
＊ 混合液のトータル容量は、120 µL を超えないように注意する。

❹ ExoFectin® - エクソソーム -small RNA 混合液をキュベットに移す（混合液でキュベットの底を覆い、気泡が入らないように注意する）。キュベットに蓋をする。

❺ 混合液の入ったキュベットを、エレクトロポレーターキュベットホルダーに挿入する。400 mV、パルスタイム 10 ～ 15 秒で混合液をエレクトロポレートする。

❻ エレクトロポレート完了後、キュベットを取り出し、1 × PBS 500 µL をキュベットに加える。キットに添付の無菌ピペットを使用して、混合液を新しい無菌チューブ（予め 1%BSA を含む 1 × PBS 1.5 mL を入れておく）に移す。この時点でエクソソームには small RNA が導入されている。

【オプション】
❼ PureExo® エクソソーム単離キット（品番：P100）を用いてエクソソームを沈殿させる。

❽ small RNA を導入したエクソソームについて、下記のようなアプリケーションに使用できる。

●エクソソームを使ってターゲット細胞に RNA をデリバリー：
1%BSA を含む 1 × PBS にエクソソームを懸濁する。ターゲット細胞を 48 時間飢餓状態にする。もしくは、50% コンフルエントに達するまでターゲット細胞を FBS 枯渇状態で培養する。small RNA を導入したエクソソームを加える。48 ～ 72 時間培養を続けた後、細胞を回収し、リアルタイム RT-PCR でターゲット遺伝子の発現を測定する。

●*in vivo* RNA デリバリー（動物への静脈注射（尾部注射など）または局所注射（筋肉内注射など）によるデリバリー）：
単離したエクソソームを 5% グルコース通常食塩水に再懸濁し、レシピエント動物に注射する。注射を繰り返すことで、エクソソームデリバリーの効果を増強することができる。免疫抵抗を最小限に抑えるために、エクソソームの由来と同じ種のレシピエント動物を選択することを推奨する。エクソソームデリバリー後、各種時点において、挿入した組織におけるターゲット遺伝子の発現を、リアルタイム RT-PCR を用いて測定するか、映像法を用いてターゲット遺伝子の発現を検出する。

[101 Bio, LLC　メーカー略号：OBL]

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ExoFectin® sRNA-into-Exosome Kit (Electro)	P400	1 kit（10 rxns）	¥175,000	㊞

■関連商品　sRNA-into-Exosome Kit（Chemical）

独自の組成のポリマー試薬で、miRNA、siRNA などの small RNA をエクソソームに導入（トランスフェクション）するための商品です。

構成内容
●ExoFectin Reagent
●Supplemental buffer

商品使用文献
【sRNA-into-Exosome Kit（Chemical）（品番：P401）】

1. Salama A, Fichou N, Allard M, Dubreil L, De Beaurepaire L, Viel A, Jégou D, Bösch S, Bach JM. **MicroRNA-29b modulates innate and antigen-specific immune responses in mouse models of autoimmunity.** *PLoS One*. 2014 Sep 9;9(9):e106153. doi: 10.1371/journal.pone.0106153. (Sold through our European distributor Gentaur.)

[101 Bio, LLC　メーカー略号：OBL]

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ExoFectin® sRNA-into-Exosome Kit (Chemical)	P401	1 kit（20 rxns）	¥151,000	㊞

機能解析　タンパク質 / RNA/DNA 抽出　遺伝子操作　観察　基礎（調製・検出）　EVs・EVs 産生　EVs 精製　エクソソームマーカー抗体　ELISA　FC/FCCS　リキッドバイオプシー　cf-DNA/cf-RNA 精製　その他　受託サービス

WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 43741

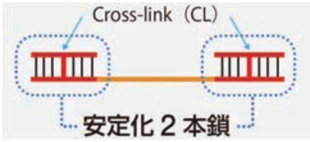
CL-AMO　miRNA 阻害核酸

コスモ・バイオ株式会社

安定化 2 本鎖を有する強力なマイクロ RNA 阻害核酸

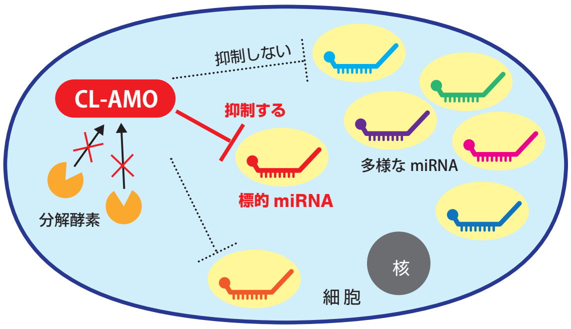
CL-AMO は、クロスリンクして安定化させた 2 本鎖（CL）をアンチセンス配列の両末端に接続した構造を持つ強力な Anti-miRNA oligonucleotide（AMO）です。他の AMO に比べて遥かに高い細胞内安定性と miRNA 阻害効果を有しています。

国立研究開発法人 産業技術総合研究所との共同研究により開発しました。



特長

●細胞内で高い安定性
●高い標的 miRNA 特異性
●高い標的 miRNA 結合力



背景

マイクロ RNA（miRNA）は 18 ～ 23 塩基の内在性ノンコーディング RNA の一種で、メッセンジャー RNA（mRNA）の非翻訳領域に結合して遺伝子発現の制御を担っています [1, 2]。様々な遺伝子が miRNA による制御を受けるため、miRNA は様々な疾患とも密接に関わっています [3, 4]。Anti-miRNA oligonucleotide（AMO）は標的 miRNA と相補的な配列（アンチセンス配列）を有し、miRNA に結合してその機能を抑制する人工核酸です。細胞内の核酸分解酵素に対する耐性を獲得させるために、一般的に AMO には様々な化学修飾や二次構造が導入されています。

CL-AMO は、クロスリンクして安定化させた 2 本鎖（CL）をアンチセンス配列の両末端に接続した構造を持ち、従来の AMO に比べて非常に強力な AMO です [5]。

データ例

■安定な阻害効果

細胞のがん化と深く関係する miR-21 を標的とする CL-AMO を乳がん細胞株（MCF-7、ZR-75）にトランスフェクションし、細胞増殖変化を WST-8 法により測定しました。CL-AMO は 9 日間にわたって安定的に細胞増殖を抑制しました（図 1A、B）。

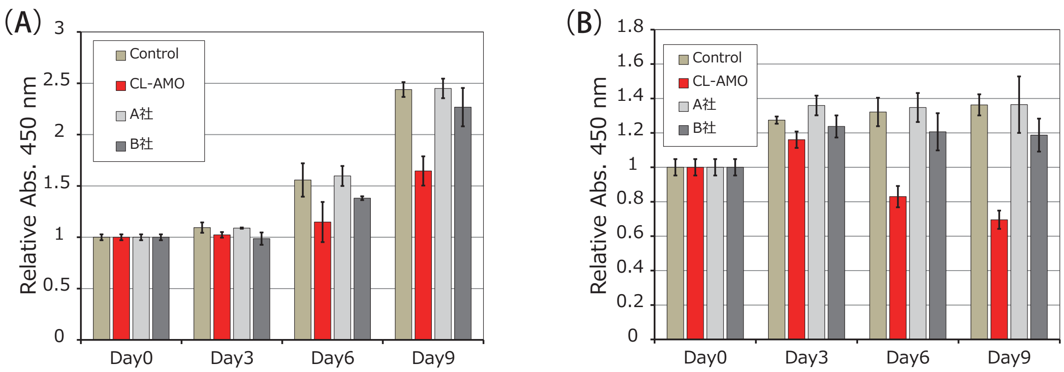


図 1　miR-21 を標的とする AMO をトランスフェクションした MCF-7 細胞（A）および ZR-75 細胞（B）の細胞数の変化。トランスフェクションした日を 1 とした相対値で表示。

■高い標的特異性

MCF-7 細胞に、miR-21 を標的とする CL-AMO またはランダム配列を有するネガティブコントロール CL-AMO をそれぞれトランスフェクションし、細胞増殖変化を WST-8 法で測定しました。miR-21 を標的とした CL-AMO のみが増殖抑制効果を示しました（図 2）。

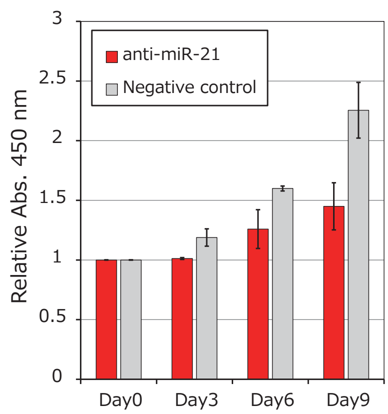


図 2　miR-21 を標的とする CL-AMO またはネガティブコントロール CL-AMO を MCF-7 細胞にトランスフェクションした場合の細胞数の変化。トランスフェクションした日を 1 とした相対値で表示。

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/cf-RNA 精製
その他
受託サービス

■低発現 miRNA にも効果的

一般的に低発現 miRNA の抑制効果は検出しにくいと考えられています。乳がん細胞における発現量が少ないとされる miR-148a を標的とする様々な AMO を MCF-7 細胞にトランスフェクションしたところ、CL-AMO のみが低濃度でも増殖抑制を示しました（図 3）。

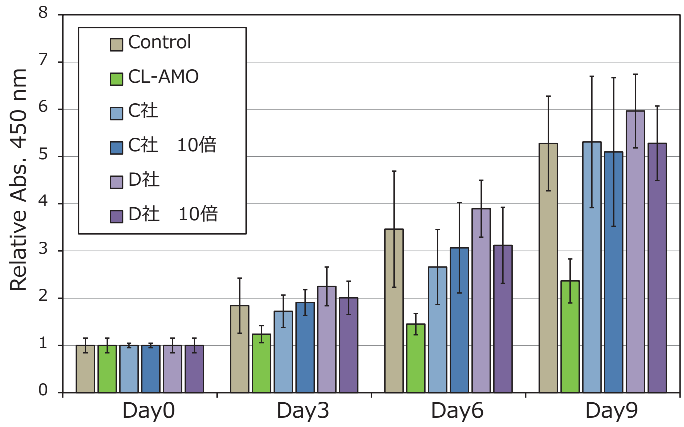


図 3　miR-148a を標的とする AMO を終濃度が 20 nM もしくは 200 nM となるようにトランスフェクションした MCF-7 細胞の細胞数の変化。トランスフェクションした日を 1 とした相対値で表示。

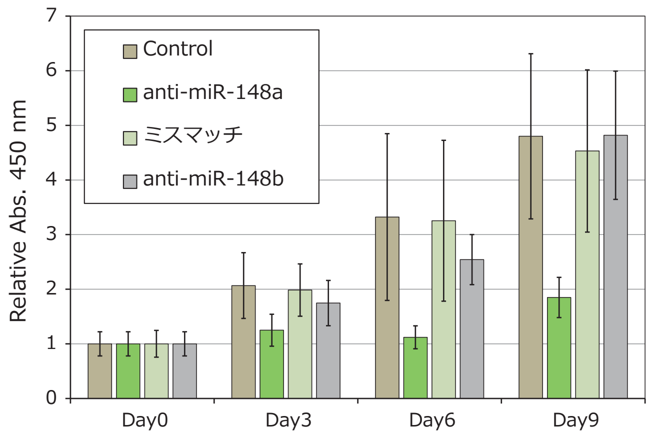
2021 年 論文発表しました！

従来の AMO では解らなかった、**低発現 miRNA の機能**を、CL-AMO が明らかにしました。

『Stable duplex-linked antisense targeting miR-148a inhibits breast cancer cell proliferation』

Okumura *et al*., Scientific Reports 11, 11467 (2021)

■類似 miRNA を見分ける高い標的特異性



miRNA には類似した配列を持つものが多く存在するため、正しい標的 miRNA のみを特異的に阻害することが重要です。miR-148a を標的とする CL-AMO、配列の一部にミスマッチを含む CL-AMO、さらに miR-148a と類似した miRNA である miR-148b を標的とする CL-AMO を MCF-7 細胞にトランスフェクションしたところ、miR-148a と完全に相補な CL-AMO のみが増殖抑制を示しました（図 4）。

図 4　各 CL-AMO の終濃度が 20 nM となるようにトランスフェクションした MCF-7 細胞の細胞数の変化。トランスフェクションした日を 1 とした相対値で表示。

参考文献

1) Fabian, M. R., Sonenberg, N. & Filipowicz, W. Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. Annu. Rev. Biochem. 79, 351-379 (2010).
2) Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. Cell 136, 215-233 (2009).
3) Li, Y. & Kowdley, K. V. MicroRNAs in Common Human Diseases. Genomics, Proteomics Bioinforma. 10, 246-253 (2012).
4) Ardekani, A. M. & Naeini, M. M. The role of microRNAs in human diseases. Avicenna J. Med. Biotechnol. 2, 161-179 (2010).
5) Mie, Y. *et al*. Function Control of Anti-microRNA Oligonucleotides Using Interstrand Cross-Linked Duplexes. Mol. Ther. - Nucleic Acids 10, 64-74 (2018).
6) Okumura, S., Hirano, Y. & Komatsu, Y. Inhibition of breast cancer cell proliferation with anti-microRNA oligonucleotides flanked by interstrand cross-linked duplexes. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 39, 225-235 (2019).
7) Okumura, S., Hirano, Y. & Komatsu, Y. Stable duplex-linked antisense targeting miR-148a inhibits breast cancer cell proliferation, Scientific Reports 11, 11467 (2021).

■お見積もり・お問い合わせ先

カスタム製造を承ります。詳細はお問い合わせください。

コスモ・バイオ株式会社　札幌事業部
E-mail：primarycell@cosmobio.co.jp

［コスモ・バイオ株式会社　　メーカー略号：CSR］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CL-AMO, anti-hsa-miR-21-5p	CLAM-H21-5	1 nmol	￥45,000	凍
CL-AMO, negative control1	CLAM-NC1	1 nmol	￥45,000	凍

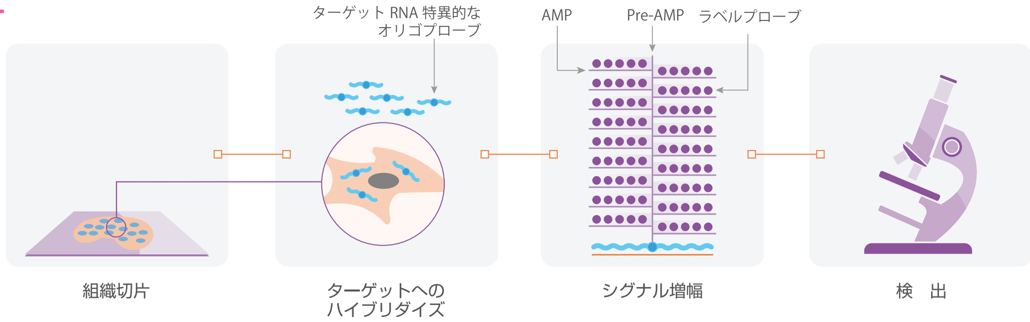
miRNAscope™ miRNA *in situ* hybridization

ACD a bio-techne brand

［Advanced Cell Diagnostics, a brand of Bio-Techne Corporation　メーカー略号：ADC］

RNAscope® は、FFPE 組織、凍結組織、培養細胞等のサンプル中の RNA を、独自の RNA *in situ* hybridization 法により検出する技術です。miRNAscope™ は、RNAscope® を応用した miRNA *in situ* hybridization 法で、従来の RNAscope® では検出が難しかった短鎖 RNA（mature miRNA やアンチセンスオリゴヌクレオチド等の核酸医薬）を組織上で検出可能です。内在性 miRNA の局在解析や核酸医薬の生体内安定性評価にご利用いただけます。

ワークフロー



特長

- miRNA、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどの短鎖 RNA（17 ～ 50 nt）を検出可能
- FFPE 組織、新鮮／固定 凍結組織、培養細胞など様々なサンプルに対応
- AP/Fast Red で染色（マニュアル染色、自動染色）
- 抗体を用いた免疫組織染色と組み合わせ可能

miR-223-3p の検出

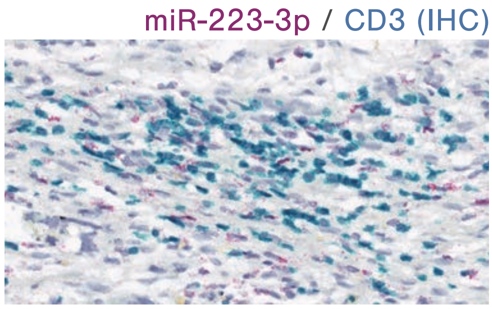


図 1　miRNAscope™ アッセイにて、ヒト子宮頸がん組織中の miR-223-3p を染色した（赤色）。その後、抗 CD3 抗体を用いて免疫組織染色を行った（緑色）。

■詳細は Web へ
試薬キットの詳細はコスモ・バイオのWeb をご覧ください。
WEB 記事ID 43882 検索

アンチセンスオリゴヌクレオチド

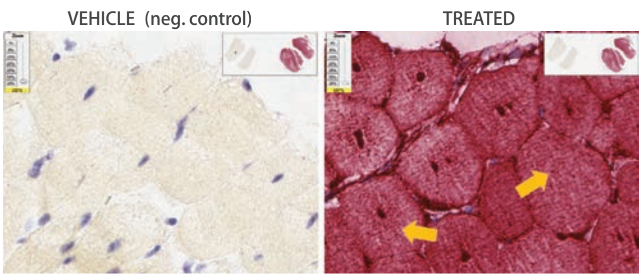


図 2　miRNAscope™ アッセイにて、マウス大腿四頭筋組織中のアンチセンスオリゴヌクレオチドを検出した（赤色）。
アンチセンスオリゴヌクレオチドを投与していないコントロール群ではシグナルは見られず、投与群において、アンチセンスオリゴヌクレオチドのデリバリーを確認できた。

内在性 miRNA ／免疫組織染色との共染色

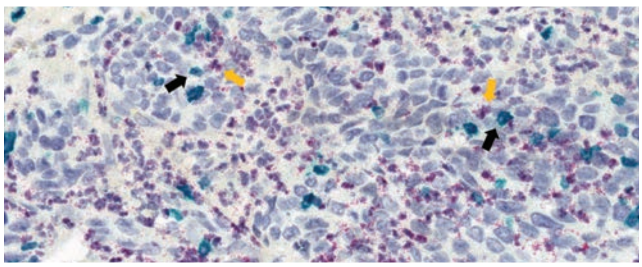


図 3　miRNAscope™ アッセイにて、ヒト子宮頸がん組織中の miR-223-3p を染色した（赤色）。その後、抗 CD3 抗体を用いて免疫組織染色を行った（緑色）。

siRNA

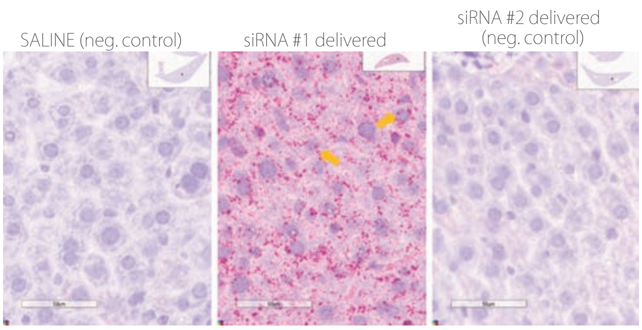


図 4　siRNA#1 に対するプローブを用いて miRNAscope™ アッセイを行った。siRNA#1 を導入したマウスの肝臓組織では赤色のシグナルが検出され、siRNA を導入していないマウスの肝臓組織や異なる配列の siRNA（siRNA#2）を導入したマウスの肝臓組織では赤色のシグナルは見られなかった。

コントロール実験

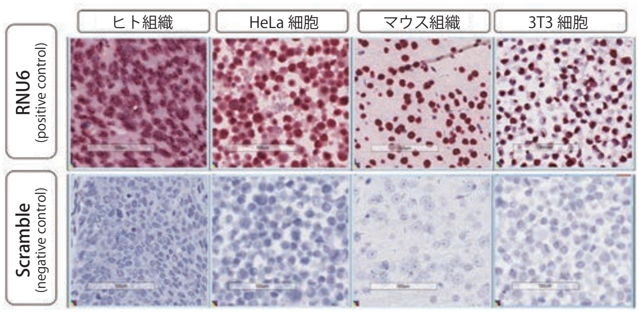


図 5　コントロールプローブを用いて、ヒトおよびマウス由来試料を染色した。
ポジティブコントロールプローブ（品番：727871-S1）：U6 small nuclear 1（RNU6-1）に対するプローブ
ネガティブコントロールプローブ（品番：727881-S1）：スクランブル配列のプローブ

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/cf-RNA 精製
その他
受託サービス

■関連商品　RNAscope™ Plus smRNA-RNA Assay

smRNA と mRNA を同時検出！

miRNAscope™ と RNAscope® の技術を組み合わせた RNA *in situ* hybridization（ISH）法です。miRNA、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）などの small RNA（smRNA）と mRNA を同時に検出可能です。

50 ～ 300 塩基のターゲットを検出する BaseScope™、300 塩基以上のターゲットを検出する RNAscope® もございます。

BaseScope™　記事ID 17257 検索

RNAscope®　記事ID 9056 検索

特長

- 独自の RNA ISH 法による高感度・特異的な検出
- 1 つの smRNA（17 ～ 50 塩基）と 3 つの mRNA（300 塩基以上）の最大 4 ターゲットを同時検出可能
- FFPE と新鮮凍結切片に対応
- TSA vivid や Opal を用いた蛍光多重染色

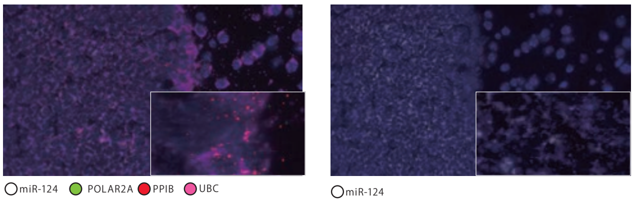


図 6　RNAscope™ Plus smRNA-RNA Fluorescent Assay を使用したマウス脳組織における miR-124 の組織特異的検出

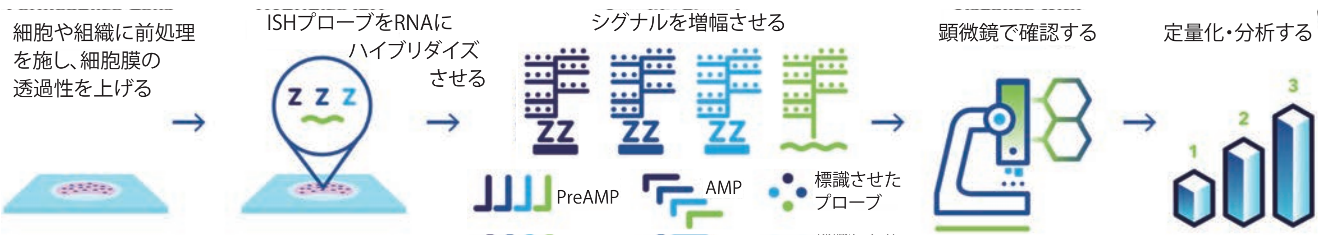
必要な試薬と機器

- ターゲットプローブ
  Advanced Cell Diagnostics 社のサイトから既存プローブをご確認いただけます（https://acdbio.com/）。
  プローブの検索方法は、コスモ･バイオの Web でご案内しております。
  WEB 記事ID 44400 検索
  既存プローブがない場合、プローブのカスタム作製も承ります。
- 試薬キットおよび蛍光色素
- ポジティブコントロール／ネガティブコントロール
- コントロールスライド：
  ターゲットと同一の種のスライドをご選択いただきます。
- ハイブリダイゼーションシステム
- その他関連試薬
- 疎水性撥水ペン

■詳細は Web へ

本商品の詳細は、コスモ･バイオのWeb をご覧ください。
WEB 記事ID 44305 検索

ワークフロー



まず切片を前処理し、次に smRNA 特異的プローブ（黄緑色で図示）および RNA 特異的プローブ（紫、青、水色で図示）をターゲット RNA にハイブリダイズさせます。RNAscope™ Plus smRNA-RNA Fluorescent Assay は、それぞれ異なる蛍光体を使用する 4 つの独立したシグナル増幅システムを採用しており、4 つの位置関係だけでなく、転写産物の発現量を定量化することもできます。

■試薬キット

TSA vivid が含まれておりませんので必要に応じ別途ご購入ください。smRNA 1 つと mRNA 3 つの四重染色をする場合は、Opal 色素※が必要となります。
※Akoya Biosciences 社よりご購入いただけます。詳細はコスモ・バイオの Web よりご確認ください。 記事ID 44305 検索

[Advanced Cell Diagnostics, a brand of Bio-Techne Corporation　メーカー略号：ADC]

品名	品番	包装	希望販売価格　貯蔵
RNAscope™ Plus smRNA-RNA HD Reagents Kit	322785	1 kit（for 20 slides）	￥450,000 室冷

■蛍光色素

[Advanced Cell Diagnostics, a brand of Bio-Techne Corporation　メーカー略号：ADC]

品名	品番	包装	希望販売価格　貯蔵
TSA Vivid Fluorophore 520	323271	1 each	￥40,000 室凍
TSA Vivid Fluorophore 570	323272	1 each	￥40,000 室凍
TSA Vivid Fluorophore 650	323273	1 each	￥40,000 室凍

その他、ポジティブコントロール、ネガティブコントロール、コントロールスライド、疎水性撥水ペン、必要機器（ハイブリダイゼーションシステム）、その他関連試薬は、コスモ・バイオの Web をご覧ください。 記事ID 44305 検索

microScript microRNA cDNA 合成キット

NORGEN BIOTEK CORP.

miRNAのcDNAを簡便に増幅

トータルRNAまたは濃縮済みmicroRNA（miRNA）サンプルからcDNAを逆転写するためのキットです。

all-in-oneかつReady-to-Useのキットで、2x反応ミックスとmicroScript microRNA酵素ミックスがセットになっています。2x反応ミックスと酵素ミックス、RNAテンプレートをシングルチューブで混合するだけのシンプルなワークフローが特長です。microScript逆転写酵素は、モロニーマウス白血病ウイルス（M-MuLV；Moloney Murine Leukemia Virus）の変異型で、RNase H活性が低減され、熱安定性が増加しています。

使用方法

2x反応ミックスと酵素ミックス、RNAテンプレートをシングルチューブで混合し、次いで、サーマルサイクラーで反応させると、poly(A)tailは最初にRNAへ付加され、続いてアダプタープライマーを用いてcDNA合成を行います。シングルチューブでの調製は、使いやすさに加えて優れた一貫性と感度を実現します。合成されたcDNAは、ユニバーサルPCRリバースプライマーとmicroRNA配列を含むフォワードプライマーを用いて、PCRまたはqPCRにご利用いただけます。シングルチューブでのcDNA調製は、異なるmicroRNAを同時にいくつもPCR増幅する場合に有用です。さらに、トータルRNAからのcDNA調製は、遺伝子特異的プライマーを用いてmRNAや長鎖RNAのPCRまたはqPCR検出にも使用することができるため、microRNA / microRNAターゲットを並列で評価することを可能にします。

特長

- **便利**
  Ready-to-Useのマスターミックスにテンプレートと酵素を加えるだけの逆転写酵素反応セットアップ
- **一回のcDNA合成で、複数のmicroRNA、microRNAターゲットを解析**
  各microRNA cDNA合成反応後に、異なるmicroRNAおよびmicroRNAターゲットをPCR検出
- **時間の節約に**
  より少ないピペット操作で逆転写反応液調製が可能
- 反応に必要なものはすべてReady-to-Useマスターミックスに入っている
- 高感度・高収量
- **ロバストな酵素**
  microScript逆転写酵素は、難しいテンプレートの増幅や高温反応における高い再現性を実現

	品番：54410（12反応分）	品番：54410（50反応分）
microScript microRNA 酵素ミックス	12 µL	50 µL
2x反応ミックス	120 µL	500 µL
ユニバーサルPCR リバースプライマー	60 µL	250 µL
Nuclease-Free Water	1.25 mL	2 × 1.25 mL

表　構成内容

測定データ

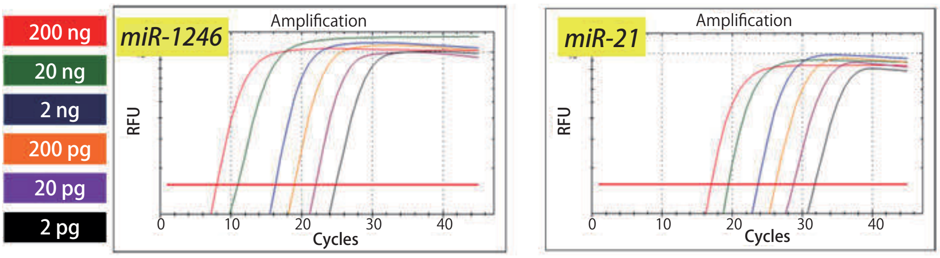


図1　高感度でロバストなmicroRNA増幅
microScript microRNA cDNA合成キットを用いて、200 ng～2 pgの各RNA量でmicroRNAを増幅した。microScript microRNA cDNA合成キットをRT-qPCR反応に利用し、Total RNA精製キットで分離したHeLa細胞由来のトータルRNAからヒトmiR-1246とmiR-21を増幅した。これらのPCRターゲットは、幅広い範囲のいずれのRNAインプット量でも増幅された。

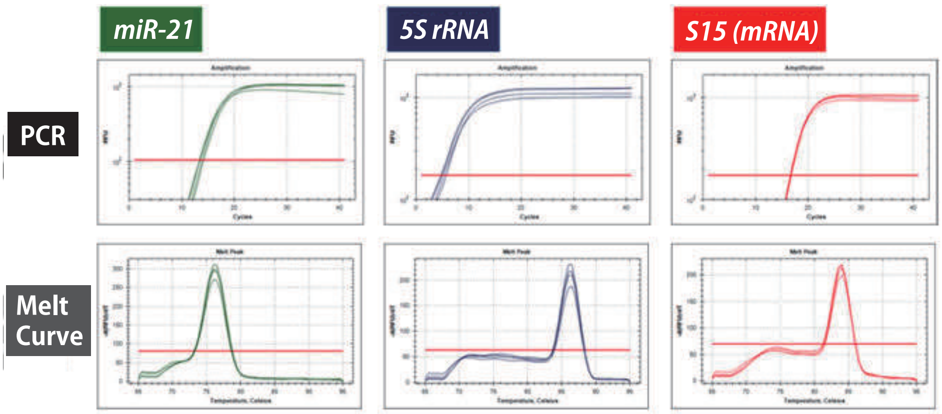


図2　トータルRNA転写産物（microRNAsおよびmRNA）のロバストな逆転写
microScript microRNA cDNA合成キットは、microRNAとmRNAや長鎖RNAなどを効率的に逆転写できるため、microRNAとmicroRNAターゲットを並列で解析できます。HeLa細胞由来のRNA（200 ng）をテンプレートとしてcDNAを合成し、3つの異なるRNAのqPCR反応に使用した。上部のパネルは、miR-21（microRNA）、5S rRNA（RNA without poly-A tail）、S15（large mRNA）の増幅の成功を示す。下部のパネルは、3つのPCR増幅アンプリコンがユニークな融解曲線の特性を有することを示す。

[Norgen Biotek Corp.　メーカー略号：NOG]

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
microScript microRNA cDNA Synthesis Kit	54415	12 rxns	¥20,000	凍
	54410	50 rxns	¥85,000	凍

■関連商品　microRNA (cel-miR-39) Spike-In Kit

[Norgen Biotek Corp.　メーカー略号：NOG]

品名／構成内容	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
microRNA (cel-miR-39) Spike-In Kit	59000	1 kit	¥12,000	凍
●cel-miR-39 RNA　●Nuclease-Free Water　●cel-miR-39 Forward PCR Primer				

Small RNA-Seq Library Prep Kit

LEXOGEN The RNA Experts

miRNA や snoRNA の解析に

Total RNA や豊富な small RNA からイルミナ社シーケンサー用ライブラリを、5 時間以内で簡単に調製できます。遺伝子発現制御において重要な役割を担っているとされる microRNA や small interfering RNA などの small RNA のプロファイリングが可能です。

特長

●ゲルフリープロトコールで操作は簡便
●5 時間以内でライブラリ調製が可能
●RNA 必要量は 50 pg から（適応範囲は 50 pg ～ 1,000 ng）
●血漿、血清、尿のような RNA 含量の低い検体にも対応
●i7 インデックスにより 96 サンプルまでマルチプレックス解析が可能
●TraPR small RNA 単離キットと併用可能（17 ページでご紹介）

構成内容

●Reagent box
●Purification Columns / Collection Tubes
●Small RNA i7 Index Plate またはプライマー（キットサイズにより異なります）
●Purification Module with Magnetic Beads（品番：058.08 と 058.24 のみ）

対応機種

●HiSeq 2000/2500/3000/4000
●NextSeq 500/550
●MiSeq
●MiniSeq
●Genome Analyzer

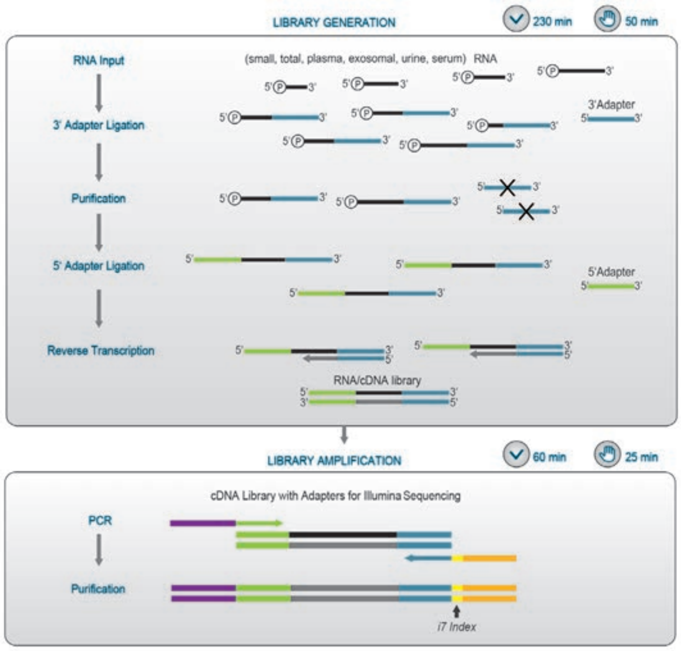


図 1　ワークフロー
ライブラリ作製は、total RNA や small RNA の 3' 末端側と 5' 末端側にアダプターを付けること（ライゲーション）をベースにしている。まず、両末端（5' 末端と 3' 末端）にアダプターを付加した RNA をもとに cDNA を合成し、PCR ステップで i7 インデックスを付加する。この i7 インデックスの付加によりマルチプレックス解析が可能になる。多くの場合、特に試料 RNA に microRNA が多く含まれる場合、作製したライブラリはイルミナ社シーケンサーにそのまま使用できる。一方、リンカー同士の結合産物（ダイマーなど）の除去や、total RNA ライブラリから small RNA ライブラリを分けたい場合は、Lexogen 社の磁気ビーズによる精製モジュールを利用できる。

パフォーマンス

Small RNA-Seq Kit は少量の RNA で、microRNA 発現解析のためのライブラリ作製が可能です（図 2）。高感度な検出により、血漿、血清、尿等のリキッドバイオプシー（エクソソーム含む）のような RNA 含量の低い検体での解析に適しています。加えて、本キットは、異なるインプット量やサンプル間でも高い再現性と相関性を示します。

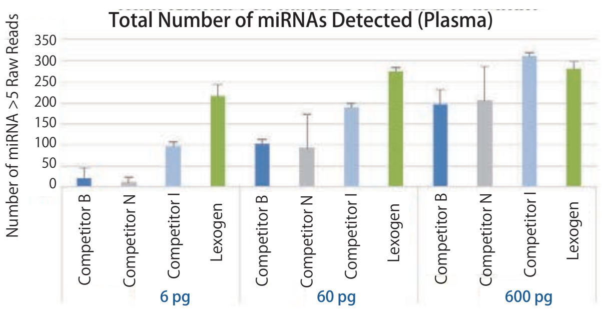


図 2　Lexogen 社 Small RNA-Seq Kit は少量の RNA から多くの microRNA の検出が可能
個別に作製した 4 つのライブラリにおいて、各ライブラリで検出された microRNA の総数。精製した血漿 RNA（6、60、600 pg）を用いて、4 社のライブラリ作製キットでライブラリを作製した。各ライブラリを等しいモル濃度、1.5 ～ 2 M Total Raw Reads でシーケンス解析した。Lexogen 社ライブラリ作製キットは全ての試験区、5 Raw Reads 以上で、非常に多くの microRNA を検出した。

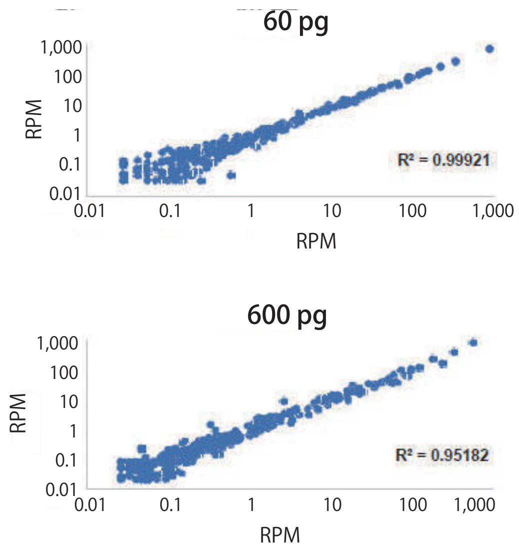


図 3　サンプル間の高い相関性：精製した血漿 RNA の各濃度（60、600 pg）、RPM（Reads per Million）で、サンプル間で高い相関性を示した。

■ FAQ あります
コスモ・バイオの Web に本商品の FAQ を掲載しています。
WEB 記事ID 43930 検索

[Lexogen GmbH　メーカー略号：LEX]

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Small RNA-Seq Library Prep Kit for Illumina	052.08 052.24	8 prep. 24 prep.	¥179,000 ご照会	室凍 室凍
Small RNA-Seq Library Prep Kit for Illumina including Purification Module with Magnetic Beads	058.08 058.24	8 prep. 24 prep.	¥195,000 ご照会	室凍 室凍

96 prep の別包装もございます。価格についてはご相談ください。

ExoBrite™ STORM EV Membrane Staining Kits

Biotium

エクソソームを染色可能な dSTORM 用蛍光染色キット

STORM で検証済みの CF® 色素が結合した、エクソソームを含む Extracellular Vesicles（EVs）を染色可能な dSTORM（direct stochastic optical reconstruction microscopy）用色素です。

ExoBrite™ STORM EV Membrane Stains は、EVs の STORM イメージングのために開発され STORM で検証済みの CF® 色素が組み込まれています。ExoBrite™ STORM EV Membrane Stains は、EV 膜の染色に使用されてきた従来の親油性色素とは異なり、バッファのみのコントロールで凝集によるバックグラウンドをほとんど示さないため、EVs を正確に識別することができます。ExoBrite™ 560/585 は、蛍光性テトラスパニン抗体とともに ONI Nanoimager S Mark Ⅱ上で dSTORM のバリデーションを行い、単一 EV の特性評価を行うことができました。

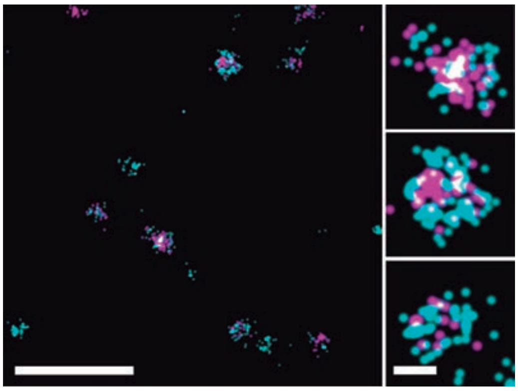


図　ヒト大腸がん細胞株由来 EVs の超解像 dSTORM 画像
EVs は、抗テトラスパニン抗体（抗 CD9/CD63/CD81 カクテル、すべて CF® 647 に結合、マゼンタ）と 1X ExoBrite™ 560/585（シアン）で染色されました。サンプルは Oxford Nanoimaging（ONI）の EV Profiler Kit で調製し、ONI の Nanoimager S Mark Ⅱで画像を取得した。データは、ONI のクラウドベースのデータ解析プラットフォームである CODI のベータリリースバージョンを使用して処理した。スケールバーは 500 nm（左）、シングル EV パネル（右）は 50 nm である。画像提供：ONI

特長

- ●EVs とエクソソームの膜を染色可能
- ●STORM による超解像イメージング用に開発
- ●高シグナル、低バックグラウンド
- ●精製済みもしくはビーズに結合したエクソソームを染色可能
- ●抗体との共染色が可能
- ●4 色の蛍光から選択可能

構成内容

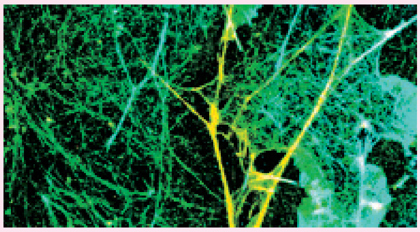
- ●ExoBrite™ STORM EV Membrane Stain
- ●ExoBrite™ Reconstitution Solution

背景

エクソソームを含む EVs は、細胞から放出される脂質結合小胞です。EVs は、特異的な表面タンパク質を有しており、核酸などの様々な物質を内包し、身体の異なる部位の細胞に情報を伝達することができます。これらにより、EVs の研究はドラッグデリバリーや医療診断用アプリケーションへの応用の可能性があるとして、急速に研究が進められました。dSTORM のような超高解像度顕微鏡技術は、従来の光学顕微鏡の回折限界を超え、EVs に見られるタンパク質などの細胞内構造の単一分子を観察することができます。

■その他綺麗な dSTORM 画像は Web へ

dSTORM 観察用に染色したエクソソームの画像が紹介されています。下記から論文に使われている画像をご覧いただけます。



［Biotium, Inc.　　メーカー略号：BTI］

品名	励起波長／蛍光波長	検出チャネル	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ExoBrite™ STORM CF® 505 EV Membrane Staining Kit	505/519 nm	FITC	30115-T 30115	1 kit（100 labelings） 1 kit（500 labelings）	￥46,000 ￥156,000	㊎ ㊎
ExoBrite™ STORM CF® 583 EV Membrane Staining Kit	583/609 nm	Rhodamine or Texas Red®	30116-T 30116	1 kit（100 labelings） 1 kit（500 labelings）	￥46,000 ￥156,000	㊎ ㊎
ExoBrite™ STORM CF® 647 EV Membrane Staining Kit	652/668 nm	Cy® 5	30117-T 30117	1 kit（100 labelings） 1 kit（500 labelings）	￥46,000 ￥156,000	㊎ ㊎
ExoBrite™ STORM CF® 680 EV Membrane Staining Kit	681/698 nm	Cy® 5.5	30118-T 30118	1 kit（100 labelings） 1 kit（500 labelings）	￥46,000 ￥156,000	㊎ ㊎

■関連商品

Biotium 社では、ExoBrite™ EV Membrane Stains と ExoBrite™ Antibody Conjugates もご提供しています。

ExoBrite™ 染色は、抗体染色（例えば、テトラスパニンタンパク質 CD9、CD63、CD81 の抗体）と組み合わせて、複数のパラメーターを分析することができます。Biotium 社は、フローサイトメトリーまたはウエスタンブロットによる EV の検出に最適化された有効な ExoBrite™ 抗体のご用意がございます。また、フローサイトメトリーによる精製またはビーズ結合した EV の検出に有効な ExoBrite™ EV Membrane Stains もございます。

■詳細は Web へ

ExoBrite™ EV Membrane Staining Kits

WEB 記事ID 42908 検索

脂質膜染色蛍光色素 CellBrite® Steady

Biotium

エクソソームの膜染色に、長期的な細胞イメージングが可能！

細胞外小胞とエクソソソームは、脂質二重層で囲まれた小胞です。これらの膜は、細胞膜の染色に用いられるのと同じ色素を用いて染色することができます。しかし、すべての色素がエクソソームの染色に同じように適しているわけではありません。Biotium社は、鮮やかな染色を示し、凝集を最小限に抑えた（あるいは全く凝集しない）蛍光色素を各色ご提供しています。

■CellBrite® Steady 膜染色キット

本色素は、**数時間から数日間**の長期的な脂質二重層のイメージング用に設計されており、フローサイトメトリーで検出するための染色に優れています。凝集を最小限に抑えた明るい染色を示します。複数色を提供しており、**その中でCellBrite® Steady 488、CellBrite® Steady 550、CellBrite® Steady 650では、細胞外小胞の染色に推奨しています**。CellBrite® Steady 550と650は、STORMによる超解像イメージングに対応しています。キットに含まれるCellBrite® Steady エンハンサーを使用すると、エクソソームや細胞の膜をイメージングするために、細胞質染色を軽減または排除できます。

本色素は、精製された細胞外小胞（EV）およびエクソソームの標識について検証されています。しかし、Biotium社のテストでは、CellBrite® Steadyがビーズ結合エクソソームに非特異的に結合することが示されました。精製エクソソームとビーズ結合エクソソームの両方を最適に標識するには、ExoBrite™ Membrane Staining Kitsをお勧めします。（84ページ参照）

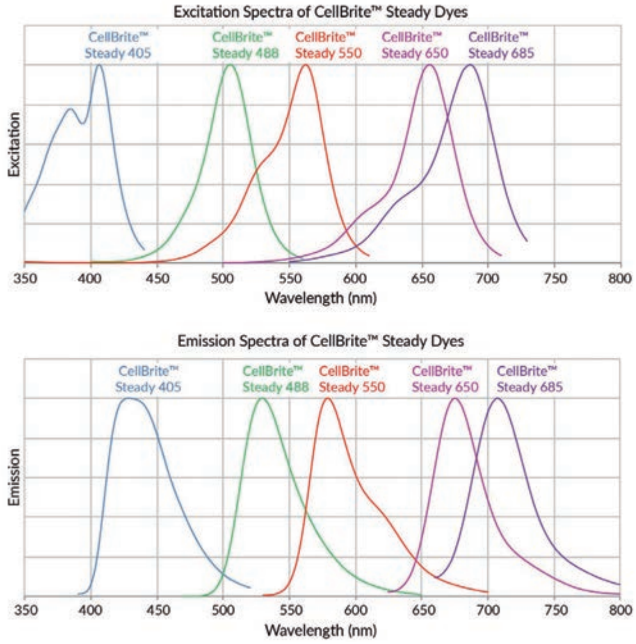


図1　Excitation and emission spectra of CellBrite® Steady Dyes in methanol.（関連商品の情報含む。）

特長

●エクソソームの膜表面を24時間以上イメージング
●急速に内部移行する他の膜色素とは異なり、膜表面に保持される
●エクソソーム内のシグナルをマスクするエンハンサーを含む
●CellBrite® Steady 550と650は、STORMによる超解像イメージングに対応

構成内容

●CellBrite® Steady 色素、1,000 × in DMSO, 100 µL
●CellBrite® Steady エンハンサー、1,000 × in DMSO, 100 µL

エンハンサーはエクソソーム内の蛍光をマスクして、膜を選択的に可視化します。特に遠赤色のCellBrite® Steady 650では、細胞質内の蛍光をほぼ完全にマスキングします。

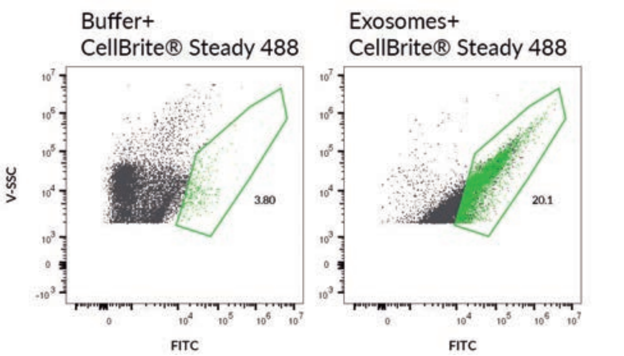


図2　濃縮したエクソソームを、10X CellBrite® Steady 488で染色した（右）。バッファー中のCellBrite® Steady 488と比較して、特異的な染色が見られた（左）。エクソソームは、FITCチャネルのCytoflexLXフローサイトメーターで検出した。

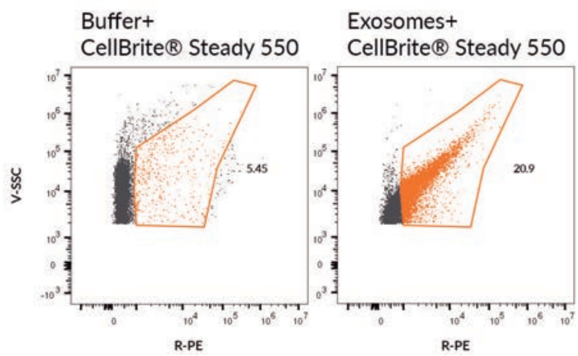


図3　濃縮したエクソソームは、0.5X CellBrite® Steady 550で染色した（右）。バッファー中のCellBrite® Steady 550と比較して、特異的な染色が見られた（左）。エクソソームは、PEチャネルのCytoflexLXフローサイトメーターで検出した。

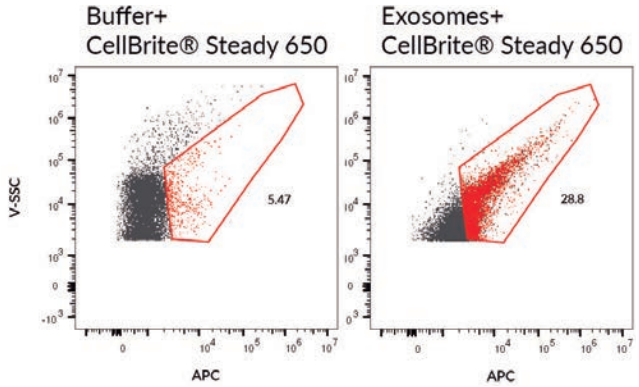


図 4　濃縮したエクソソームを、2X CellBrite® Steady 650 で染色した（右）。バッファー中の CellBrite® Steady 650 と比較して、特異的な染色が見られた（左）。エクソソームは、APC チャネルの CytoflexLX フローサイトメーターで検出した。

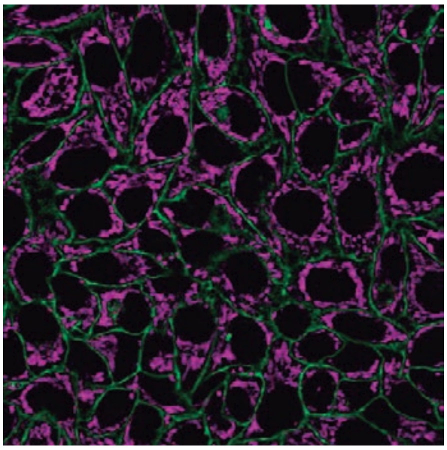


図 5　CellBrite® Steady 488（緑）（エンハンサー使用）と MitoView™ 633 ミトコンドリア染色（マゼンタ）で 45 分間共染色した HeLa 細胞（生細胞）。細胞は、洗浄ステップなしで共焦点顕微鏡で観察した。

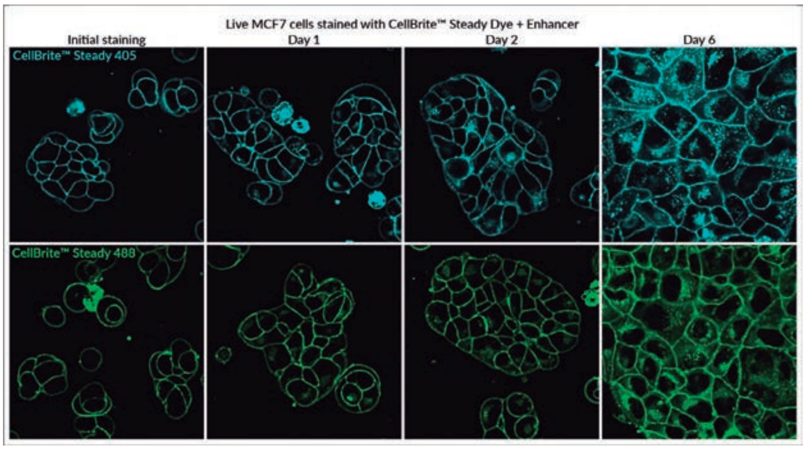


図 6　CellBrite® Steady Dyes（エンハンサー使用）による長期染色。MCF7 細胞を 1 × CellBrite® Steady 405 または CellBrite® Steady 488 色素で染色し、0.2 ×エンハンサーと最大 6 日間共培養した。細胞は、洗浄ステップなしで共焦点顕微鏡で観察した。

■注意点

CellBrite® Steady 染色試薬は細胞間を容易に移行するため、細胞追跡、共培養、または移植研究には推奨されません。
別キットの ViaFluor® SE Cell Proliferation Kit は染色に安定性があり、かつ非毒性で、顕微鏡やフローサイトメトリーによる長期追跡に使用できます。

WEB 記事ID 44320 検索

■CellBrite® Steady Membrane Stains

［Biotium, Inc.　メーカー略号：BTI］

品名	励起波長	蛍光波長	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CellBrite® Steady 488 Membrane Staining Kit	505	529	30106	1 kit（500 labelings）	¥212,000	凍
CellBrite® Steady 550 Membrane Staining Kit	562	579	30107	1 kit（500 labelings）	¥212,000	凍
CellBrite® Steady 650 Membrane Staining Kit	656	676	30108	1 kit（500 labelings）	¥212,000	凍

上記商品は、トライアルサイズ（100 labelings）も販売しております。品番の最後に“-T”を加えてください（希望販売価格：¥57,000）。

■関連商品

［Biotium, Inc.　メーカー略号：BTI］

品名	励起波長	蛍光波長	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CellBrite® Steady 405 Membrane Staining Kit	406	428	30105	1 kit（500 labelings）	¥212,000	凍
CellBrite® Steady 685 Membrane Staining Kit	686	708	30109	1 kit（500 labelings）	¥212,000	凍

上記商品は、トライアルサイズ（100 labelings）も販売しております。品番の最後に“-T”を加えてください（希望販売価格：¥57,000）。

■関連商品　CellBrite® Fix Membrane Stains

CellBrite® Fix Membrane Stains は、細胞膜に蓄積して蛍光を発する蛍光色素で、膜タンパク質に共有結合するためのアミン反応性基を持っています。CellBrite® Fix Membrane Stains は、Santiana 氏らのウイルス感染における小胞囲い込みの役割を調査する研究において、ウイルス粒子を含む細胞外小胞の染色に使用されました。その結果、CellBrite® Fix 488 は、ノロウイルスを含む細胞外小胞で処理した培養マウスマクロファージ様細胞の相対的な感染率を比較するために、超解像顕微鏡や共焦点顕微鏡で単離した細胞外小胞を染色するのに適していることがわかりました。

［Biotium, Inc.　メーカー略号：BTI］

品名	励起波長	蛍光波長	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CellBrite® Fix 488	406	428	30090	1 kit（5 vials）	¥163,000	凍
CellBrite® Fix 555	505	529	30088	1 kit（5 vials）	¥141,000	凍
CellBrite® Fix 640	562	579	30089	1 kit（5 vials）	¥141,000	凍

上記商品は、トライアルサイズ（1 vial）も販売しております。品番の最後に“-T”を加えてください（希望販売価格：品番：30090-T は ¥48,000、それ以外は ¥40,000）。

Exosome-TEM-easy キット

101 Bio

透過型電子顕微鏡（TEM）用エクソソームサンプル調製キット

本商品は、透過型電子顕微鏡（TEM：transmission electron microscope）観察用のエクソソーム試料を調製するキットです。質の高い TEM 観察像を得ることができます。

TEM アッセイでは、エクソソームの純度と密度が重要になりますので、エクソソームの分離には、101 Bio 社 PureExo® シリーズを推奨しております。（55 ページ、記事ID 11648 検索）

構成内容

1. フォルムバー／カーボンコート EM メッシュ 400 グリッド：× 10
2. 洗浄バッファー：1.5 mL
3. EM 溶液：100 µL

＜その他で必要な器具・機械＞

1. パラフィルム
2. ピンセット（Dumont 社 NO.5）
3. Whatman NO.1 ろ紙
4. 透過型電子顕微鏡（TEM）

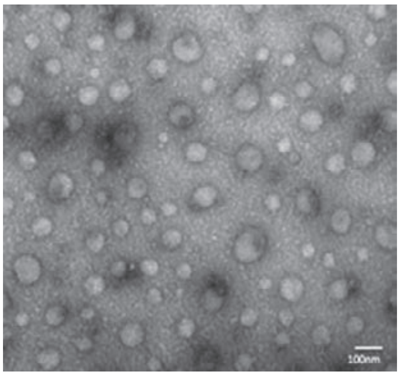


図 1　101 Bio 社 Exosome-TEM-easy kit を用いて作製した試料の TEM 観察像

プロトコール

1. 分離した新鮮なエクソソームを再懸濁する。
2. エクソソーム懸濁液を清潔なパラフィルム上に 2 ～ 3 滴（5 ～ 10 µL）置く。エクソソームの液滴上にフォルムバー／カーボンコート EM グリッドをコート面が接するように置く。ドライ条件下で、グリッド膜にエクソソームを 10 分間吸着させる。
3. 清潔なパラフィルム上に、20 µL の洗浄バッファーを滴下する。先の尖ったピンセットを用いて、グリッド膜をコート面を下向きにして、洗浄バッファーの液滴上に置き、30 秒間洗浄する。
4. ステップ 3 を繰り返す。
5. 清潔なパラフィルム上に、10 µL の EM 溶液を滴下する。EM 溶液の液滴上コート面を下向きにしてグリッドを置き、10 分間そのままにする。
6. ステップ 3 の手順で洗浄を行う。
7. コート面を上向きにした状態でグリッド膜をろ紙に移す。そのまま室温で一晩乾燥させる。
8. 透過型電子顕微鏡（TEM）下でエクソソームを観察する。

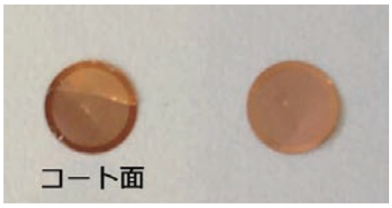


図 2　フォルムバー／カーボングリッド
光沢のある縁の有る方がフォルムバー／カーボンコート面。コート面にエクソソームが吸着する。

［101 Bio, LLC　　メーカー略号：OBL］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Exosome-TEM-easy Kit	P130-C	10 rxns	¥148,000	室

第 2 章　基礎（調製・検出）

Basics (preparation/detection)

	商品		商品	
コラム 微生物由来とミルクのエクソソーム		32 ページ～		
EVs・EVs 産生	微生物由来	33 ページ～	ミルク由来	37 ページ～
	ヒト由来	35 ページ～	母乳由来	38 ページ～
	細胞培養上清由来	35 ページ～	蛍光標識したエクソソーム	39 ページ～
	間葉系幹細胞由来	37 ページ～	FBS からのエクソソーム除去キット	40 ページ～
EVs 精製	分類表 **EVs の精製方法**	42 ページ～		
	密度勾配遠心分離媒体	44 ページ～	タンジェンシャルフローろ過	51 ページ～
	抗体アフィニティー、免疫沈降	45 ページ～	EV 用イオン交換法	53 ページ～
	ポリマー沈殿法	49 ページ～	その他の商品独自方法	55 ページ～
	サイズ排除（SEC）	50 ページ～	限外ろ過（UF）濃縮装置	63 ページ～
エクソソームマーカー抗体				
	コラム **エクソソームマーカー**	64 ページ～		
ELISA		73 ページ～		
FC/FCCS	フローサイトメトリー用のキット	84 ページ～	蛍光検出器　SMART FCCS	89 ページ～
	FACS 解析キット	87 ページ～		
総説 **FCS と FCCS　その特徴と今後の展開へ向けて** — エクソソーム研究にも利用可能な FCS と FCCS —　金城　政孝　先生				92 ページ～

微生物由来細胞外小胞

多細胞生物体内の細胞が放つエクソソームは細胞外小胞 ： EVs（Extracellular Vesicles）の１つであり、すでに医薬品および化粧品への応用が期待され各分野で開発が進行しています。一方、単細胞である微生物からも同様の EVs が放出され、20 ～ 400 nm の球状の構造体であり、エクソソームと同様に微生物 - 微生物間、さらには微生物 - 宿主細胞間の情報伝達を担っていることが明らかになっています。EVs 産生は微生物にとって不可欠な機能であり、EVs による細菌間もしくは宿主との相互作用の機能解明は、ワクチン開発のシーズや腸内における細菌の宿主への作用、ドラッグデリバリーシステム（DDS）といった様々な応用分野への展開が期待されています。

微生物学分野においては、以前よりグラム陰性細菌の分泌する細胞外小胞を Outer Membrane Vesicle（OMV）と称し、研究が盛んにされてきました。最近の研究では病態の進行に腸内細菌が関わり、そのメカニズムを EVs によって解き明かされつつあります。肝硬変の研究で大腸菌由来の EVs がマクロファージや好中球に対して炎症を惹起することが報告されています [1]。

一方で、最近ではグラム陽性細菌の EVs 研究も注目されてきており、乳酸菌由来の EVs が免疫の活性化に関与する論文がいくつか報告されています。乳酸菌由来 EVs が動物の腸管免疫系を活性化すること [2] や皮膚へ抗炎症効果を示すことが明らかになっており [3]、腸内細菌叢や皮膚疾患における EVs の有効性が大いに期待されています。また酵母や麹菌などの発酵食品に含まれる微生物由来 EVs の研究も広がっています。

今後、我々と共存している多種多様な微生物が EVs を介して生体に及ぼす影響やその機構解明から得られた知見が積極的に活用され、医薬品をはじめ食品や化粧品、農業分野などへの新たな開発と応用が期待されています。

次ページで商品を紹介しています。

参考文献

1) *Escherichia coli*-derived outer-membrane vesicles induce immune activation and progression of cirrhosis in mice and humans, Kazuki Natsui *et. al.*, *Liver International*, 08 February 2023

2) Characterization of extracellular vesicles from *Lactiplantibacillus plantarum*, *Scientific Reports*, (2022) 12:13330

3) *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles induce anti-inflammatory M2 macrophage polarization *in vitro*, Wanil Kim *et al.*, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2020, Vol. 9, 1793514

ミルクエクソソーム

ヒト、ウシ、ラットなどの広範な動物の乳中にもエクソソームが存在し、miRNA や mRNA、タンパク質などを内包し、標的細胞へ取り込まれることによってそれらが生体内で機能することが示唆されています [1]。

生乳由来のエクソソームは、ドラッグデリバリーシステム（DDS）としての研究も盛んに行われており、免疫学的毒性の低い抗がん剤の経口投与手段としても注目されています [2]。細胞由来のエクソソームとは異なる特殊な特性があること [3] や、腸管バリアを通過する能力があることから、経口送達の有望な薬物送達ツールとしての利用が期待されています [4]。

また、標準化など課題は多いものの、ミルクエクソソームは原料が生乳であり細胞培養液と比べ安価に収量が多くとれる可能性があることから工業生産的なメリットもあります。

ヒト母乳由来エクソソームは、CD63 や CD81 といったエクソソームマーカーを発現し、多くの miRNA を内包していますが、なかでも免疫に関する miRNA が多く同定されており、これらの miRNA が母から乳児に移動する可能性が示唆されています [5]。

ヒト母乳中エクソソームによる免疫細胞の制御についていくつかの報告 [6] がある一方で、ブタの乳由来のエクソソームでは、乳仔の腸管上皮細胞に対して直接増殖促進の機能を示すという報告もあり [7]、母乳中のエクソソームの機能やその作用メカニズムに関する研究もますます注目されています。

37 ページで商品を紹介しています。

参考文献

1) Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages, Hirohisa Izumi, *et al.*, *J Dairy Sci*. 2015 May; 98(5):2920-33

2) Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel, Ashish K.Agrawal *et al.*, *Nanomedicine*. 2017 Jul;13(5):1627-1636.

3) Milk exosomes: an oral drug delivery system with great application potential, *Food & Function*, Issue3, 2023

4) High-quality milk exosomes as oral drug delivery system, *Biomaterials* Volume 277, October 2021, 121126

5) microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk, N Kosaka, *et al.*, *Silence*. 2010 Mar 1;1(1):7

6) Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4+ Tcells, Näslund TI *et al.*, *AIDS*. 2014 Jan 14;28(2):171-80.

7) Porcine milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells, T Chen, *et al.*, *Scientific Reports* volume 6, Article number: 33862 (2016)

微生物由来細胞外小胞

コスモ・バイオ株式会社

微生物由来 EV（Extracellular Vesicles）の機能解明・応用研究に

乳酸菌由来細胞外小胞

乳酸菌の培養上清から超遠心分離法または限外ろ過法により EV 画分を精製した研究用試薬です。乳酸菌由来 EV のヒトへの作用や生理的機能の解明の研究を支援いたします。また、菌体そのものを利用する従来のプロバイオティクスの発展形として、医薬品、機能性食品、化粧品原材料の開発等にご利用ください。

■ *Bacillus coagulans* lilac - 01 株 EV

Bacillus coagulans は世界中で利用されている有胞子性乳酸菌で、lilac-01 ※1 は、ライラックの花から単離された株です。

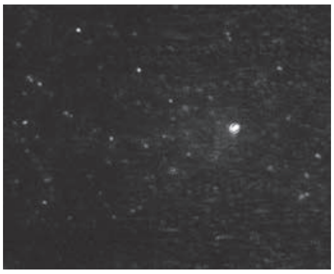


図 1 NanoSight® による乳酸菌 EV の粒子写真

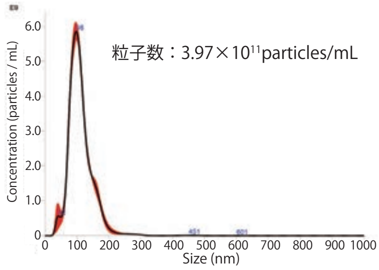


図 2 NanoSight® 粒度分布データ

■ *Leuconostoc mesenteroides* 180720-12-1 株 EV

Leuconostoc mesenteroides ※2 は、漬物などから分離される植物性乳酸菌の代表で偏性ヘテロ発酵様式をとります。

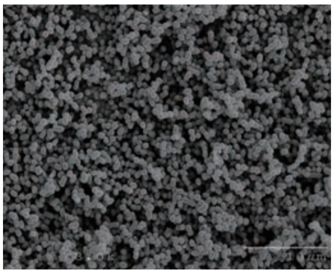


図 3 菌体の電子顕微鏡画像

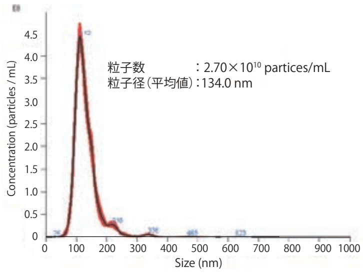


図 4 NanoSight® 粒度分布データ

■ *Lactobacillus paracasei* 180913-R1 株 EV

Lactobacillus paracasei ※2 は植物性発酵食品、発酵乳など幅広く分離される偏性ヘテロ発酵乳酸菌で免疫活性が注目されています。

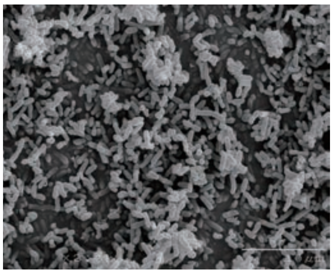


図 5 菌体の電子顕微鏡画像

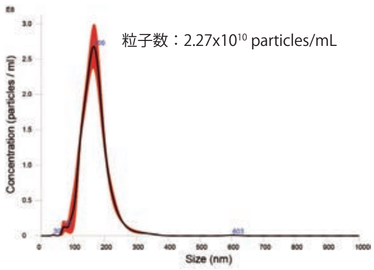


図 6 NanoSight® 粒度分布データ

酵母由来細胞外小胞（EV）

単細胞性の真菌である酵母も EVs を産生することが報告されており、様々な生理活性物質の運搬を担っていることが示唆されています。本品は、酵母の培養上清を、限外ろ過法により EV 画分を精製されています。

■ *Hanseniaspora vineae* 181019Y5-2 株 EV

Hanseniaspora vineae ※2 は自然界に広く分布する代表的な芳香性野生酵母であり、自然発酵ワインの醸造初期段階で働くことが知られています。

Kloeckera apiculata ※3 はワインの発酵初期に働くブドウ糖のみを資化するレモン型酵母で、揮発酸（酢酸）生成量が多いことが知られています。

Saccharomyces cerevisiae ※3 はアルコール耐性に優れ、醸造用・製パン用に選抜された汎用市販酵母として広く利用されています。

Saccharomyces paradoxus ※3 は遺伝的に *S. cerevisiae* の親種に相当し、アルコール耐性など優れた発酵特性を持つ酵母です。

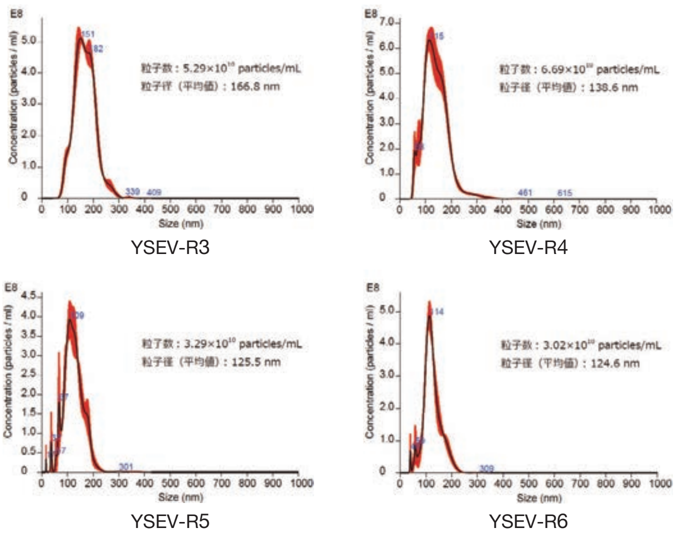


図 7 NanoSight® による酵母由来 EVs の粒度分布測定例

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/ cf-RNA 精製
その他
受託サービス

大腸菌由来細胞外小胞（EV）

グラム陰性細菌とグラム陽性細菌では EVs の放出機構が異なり、EVs の伝達する情報も異なります。特にグラム陰性細菌である大腸菌（*Escherichia coli*）由来の EVs 上には LPS が存在することから、宿主細胞に対してグラム陽性菌とは異なる反応性を示すことが報告されています。

本製品は、遺伝子工学実験に広く使用されている *Escherichia coli* DH5α の培養上清から、限外ろ過法により EVs を精製しています。

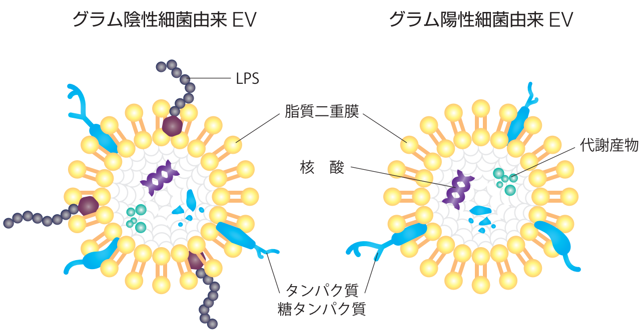


図 8

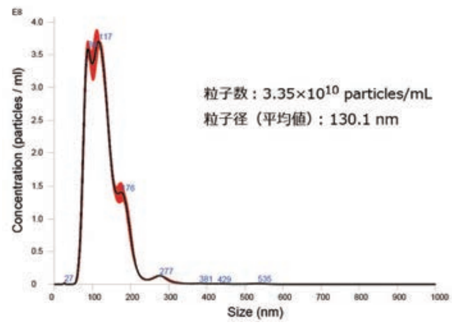


図 9　NanoSight® による大腸菌由来 EVs の粒度分布測定例

LPS 産生細菌由来細胞外小胞（EV）

■ *Pantoea agglomerans* IG1 株 EV

Pantoea agglomerans（パントエア・アグロメランス）IG1 株※4 は、植物（小麦、イネ、サツマイモ、リンゴ、ナシ、サトウキビなど）に広く共生するグラム陰性菌で、ライ麦パンの発酵過程で本菌が葉酸の産生に重要な役割を担っていること、リンゴやナシの黒カビ病を防ぐバイオ生剤として活用されていることなど食品分野にも生菌が使用されています。このように食経験の豊富な菌であり、腸内細菌の一つとしても知られています。本製品は、*Pantoea agglomerans* IG1 株の培養上清から限外ろ過法により EVs 画分を精製しています。

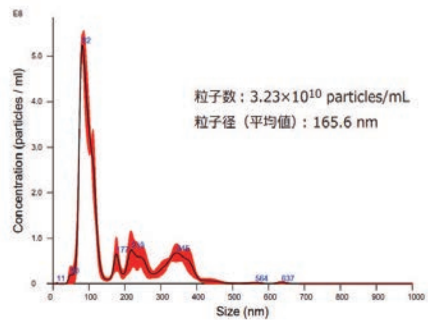


図 11　NanoSight® による Pantoea agglomerans IG1 株由来 EVs の粒度分布測定例

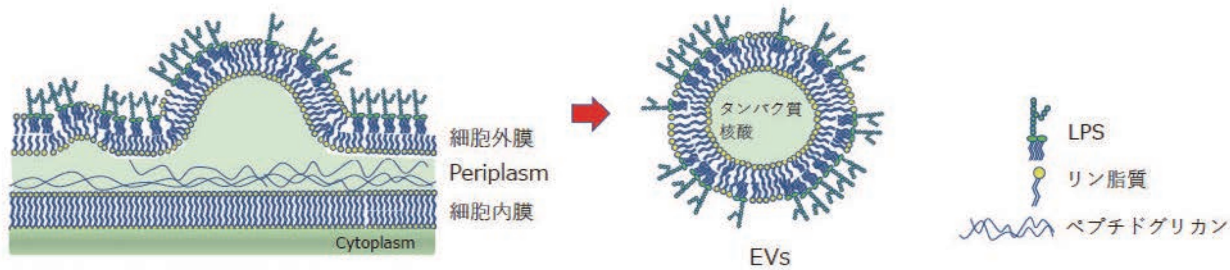


図 10　*Pantoea agglomerans* IG1 株の脂質二重膜構造と EV 産生機構

グラム陰性菌の EVs の特徴として、外膜に LPS が含まれています。しかし、主に生理活性を担うリピド A（Lipid A）部分は外膜の内側を向いており、EVs に含まれた状態では、TLR4 と反応しにくい可能性があります。そのことから、精製 LPS や菌体から遊離した LPS とは免疫細胞に対する働きが異なる可能性があります。そこで、EVs は腸内、口腔内などの共生細菌の生育環境における宿主への働きを解明する一つのツールになると考えられています。

※ 1　アテリオ・バイオ株式会社が特許を取得した（特許第 5006986 号）有胞子性乳酸菌です。
※ 2　酪農学園大学 応用微生物学研究室 山口 昭弘 教授、亀田 くるみさんら研究室生が学内植物材料や道産食材などから、独自に分離培養・同定した乳酸菌です。また電子顕微鏡画像は同大学 応用生化学研究室 岩﨑 智仁 教授の撮影です。
※ 3　酪農学園大学 応用微生物学研究室 山口 昭弘 教授、亀田 くるみさんら研究室生が学内植物材料や道産食材などから、独自に分離培養・同定した酵母です。
※ 4　自然免疫応用技研株式会社が特許を取得した（特許第 5511112 号および特許第 5517215 号）LPS 産生細菌です。

［コスモ・バイオ株式会社　　メーカー略号：CSR］

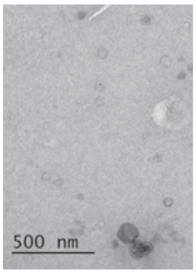
品名	由来	粒子数（mL あたり）	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
乳酸菌由来細胞外小胞	*Bacillus coagulans* lilac-01 株 EV	＞ 1 × 10^{11} particles/mL	LBEV01	200 μL/tube	¥50,000	㊅
	Leuconostoc mesenteroides 株 EV	＞ 1 × 10^{10} particles/mL	LBEV-R1-UF	200 μL	¥50,000	㊅
	Lactobacillus paracasei 株 EV	＞ 1 × 10^{10} particles/mL	LBEV-R2	200 μL/tube	¥50,000	㊅
酵母由来細胞外小胞	*Hanseniaspora vineae* 181019Y5-2 株	＞ 1 × 10^{10} particles/mL	YSEV-R3	200 μL/tube	¥50,000	㊅
	Kloeckera apiculata 180926-3 株	＞ 1 × 10^{10} particles/mL	YSEV-R4	200 μL/tube	¥50,000	㊅
	Saccharomyces cerevisiae 1611-4 株	＞ 1 × 10^{10} particles/mL	YSEV-R5	200 μL/tube	¥50,000	㊅
	Saccharomyces paradoxus 181211-12 株	＞ 1 × 10^{10} particles/mL	YSEV-R6	200 μL/tube	¥50,000	㊅
大腸菌由来細胞外小胞（DH5α）	*Escherichia coli* DH5α	＞ 1 × 10^{10} particles/mL	ECEV	200 μL/tube	¥50,000	㊅
パントエア・アグロメランス IG1 株由来細胞外小胞	*Pantoea agglomerans* IG1	＞ 1 × 10^{10} particles/mL	LPSEV01	200 μL/tube	¥50,000	㊅

エクソソームスタンダード －健常人ドナーと細胞培養上清由来－

Hansa BioMed

アッセイキャリブレーション／定量用のコントロールに

　エクソソームスタンダードは、各種アプリケーション（FACS、WB、ELISA）のリファレンス、生体サンプルの定量比較のためのキャリブレーションスタンダードとしてご利用いただけます。
　エクソソームを長期保存するための理想的な方法は凍結乾燥で、凍結乾燥品は 4℃における長期保存でも安定であることがわかっています。HansaBioMed（HNB）社では、各種生体原料（細胞培養上清、ヒト血漿、尿サンプルなど）から取得した凍結乾燥エクソソームをご提供しています。超遠心分離法とマクロフィルター法を組み合わせて単離し、全体的なタンパク質量と粒子数を NTA および Nanosight® によって定量化／検証しています。



透過型電子顕微鏡を用いた HCT116 EVs（品番 ： HBM-HCT）の観察画像

特長

- ●標準化用の高精製エクソソーム
- ●エクソソーム定量用のコントロール（spike-in）
- ●アッセイキャリブレーションに便利な Ready-to-Use フォーマット
- ●様々な生体サンプルからのエクソソーム

安定性

　凍結乾燥エクソソームは、4℃で 3 年間保存できます。
　再水和したエクソソームスタンダードは、室温での長期保存に適していないため、2 時間以内に使用してください。残った再水和スタンダードのストック溶液は、ポリプロピレンバイアル（低結合性のものが望ましい）に分注し、－20℃で 1 ヵ月間、－80℃で 6 ヵ月間保存できます。凍結溶解を繰り返さないでください。

使用例

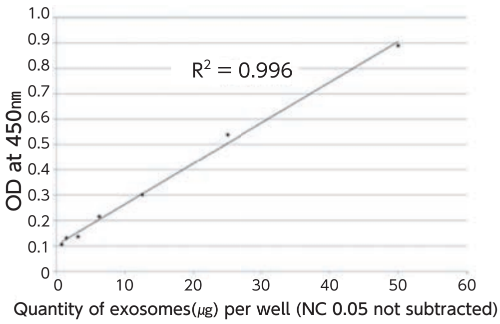


図 1　細胞培養上清から精製したエクソソームスタンダードの CD63 検出による滴定

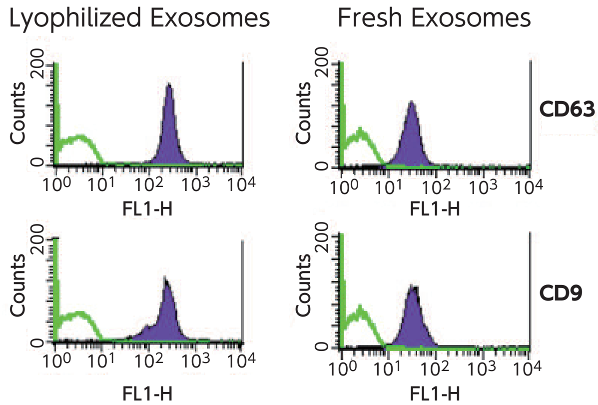


図 2　新鮮なエクソソームと凍結乾燥エクソソームにおけるエクソソームマーカーの比較
ヒト結腸がん細胞株の培養上清から分画遠心法で精製したエクソソームの FACS プロファイル

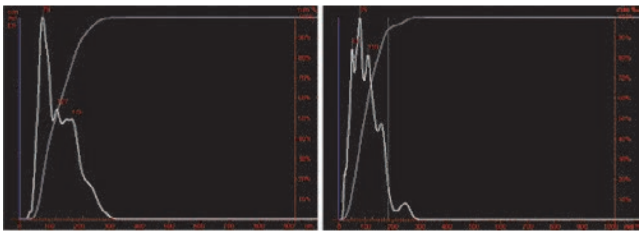


図 3　血漿由来エクソソームの Nanosight 分析の比較
左 : 新鮮なエクソソーム、右 : 凍結乾燥エクソソーム

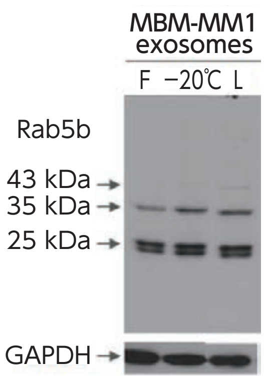


図 4　ウエスタンブロットによるエクソソームマーカー発現の比較
F : 新鮮なエクソソーム
－20℃ : 凍結エクソソーム
L : 凍結乾燥エクソソーム

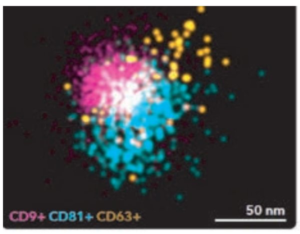


図 5　超解像蛍光顕微鏡による EV フェノタイピング

その他使用例

- ●電子顕微鏡（EM）および免疫電子顕微鏡（IEM）での観察
- ●活性アッセイ : 凍結乾燥 EV におけるアセチルコリンエステラーゼ活性
- ●EV 関連の RNA のプロファイリング

※80 ページにも本商品を使ったデータを記載しています。

次のページへ続く

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/cf-RNA 精製
その他
受託サービス

FAQ あります

Q1　エクソソームスタンダードはどのように調製されていますか？

A1　超遠心分離およびマイクロフィルトレーションによって回収したエクソソームを安定化処理し、凍結乾燥しています。エクソソームスタンダードは、ウエスタンブロット、ELISA、フローサイトメトリー、電子顕微鏡観察などの様々なアプリケーションにご使用いただけます。

Q2　凍結乾燥により小胞の形や収量は変化しますか？

A2　凍結乾燥は小胞の形に影響を及ぼしません。凍結乾燥エクソソームは 4℃保存で 3 年間安定です。

Q3　エクソソームスタンダードを水で溶解後、どのように保存すれば良いですか？

A3　溶解後は、－20℃で 1 ヵ月間または－80℃で 1 年間は安定です。凍結融解は避けてください。

Q4　なぜ PBS ではなく、水で溶解するのですか？

A4　バッファーに懸濁したエクソソームを凍結乾燥しているため、水で溶解した場合に適切なバッファー組成に戻ります。希釈が必要な場合は 1 × PBS で希釈をすると、RNA ／タンパク質抽出、qPCR、TEM アッセイ、ウエスタンブロット、細胞表面ラベリングなどの様々な実験にご使用いただけます。

Q5　Plasma Exosome Standards とはどのようなものですか？

A5　健常人ドナー由来のプール血漿から、超遠心分離およびマイクロフィルトレーションにより単離したエクソソームです（凍結乾燥品）。

Q6　ウエスタンブロットに使用する際のサンプル調製方法を教えてください。

A6　ポリアクリルアミドゲルの 1 レーンにつき、15 ～ 20 µg のエクソソームをアプライしていただくことをお勧めします。100 µg の凍結乾燥エクソソームに対し 100 µL の水を添加し、1 µg/µL のエクソソーム溶液を調製します。必要であれば、2- メルカプトエタノールまたは DTT を還元剤として添加します。CD63 や CD9 などのテトラスパニンを解析する際、還元処理は必ずしも必要ではありません。ターゲット分子およびご使用される抗体の特性をご確認のうえ、ご検討ください。

■健常人ドナー由来の凍結乾燥エクソソーム

記事ID 11967 検索　［HansaBioMed OU　メーカー略号：HNB］

品名	由来	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Lyophilized exosomes from Plasma of Healthy donors	ヒト血漿	HBM-PEP-30/2	60 µg（2 × 30 µg）	¥73,000	凍
		HBM-PEP-30/5	150 µg（5 × 30 µg）	¥163,000	凍
		HBM-PEP-100/2	200 µg（2 × 100 µg）	¥98,000	凍
		HBM-PEP-100/5	500 µg（5 × 100 µg）	¥199,000	凍
Lyophilized exosomes from Serum of Healthy donors	ヒト血清	HBM-PES-30/2	60 µg（2 × 30 µg）	¥73,000	凍
		HBM-PES-30/5	150 µg（5 × 30 µg）	¥163,000	凍
		HBM-PES-100/2	200 µg（2 × 100 µg）	¥98,000	凍
		HBM-PES-100/5	500 µg（5 × 100 µg）	¥199,000	凍
Lyophilized exosomes from Urine of Healthy donors	ヒト尿	HBM-PEU-30/2	60 µg（2 × 30 µg）	¥73,000	凍
		HBM-PEU-30/5	150 µg（5 × 30 µg）	¥163,000	凍
		HBM-PEU-100/2	200 µg（2 × 100 µg）	¥98,000	凍
		HBM-PEU-100/5	500 µg（5 × 100 µg）	¥199,000	凍

■細胞培養上清由来の凍結乾燥エクソソーム

記事ID 16252 検索　［HansaBioMed OU　メーカー略号：HNB］

品名	由来	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Lyophilized exosomes from COLO1 cell culture supernatant	COLO1 細胞株（ヒト大腸がん）	HBM-COLO-30/2	60 µg（2 × 30 µg）	¥77,000	凍
		HBM-COLO-100/2	200 µg（2 × 100 µg）	¥102,000	凍
Lyophilized exosomes from U87 MG cell culture supernatant	U87 MG 細胞株（ヒト神経膠芽腫／星状細胞腫）	HBM-U87-30/2	60 µg（2 × 30 µg）	¥77,000	凍
		HBM-U87-100/2	200 µg（2 × 100 µg）	¥102,000	凍
Lyophilized exosomes from SK-N-SH cell culture supernatant	SK-N-SH 細胞株（ヒト神経芽細胞腫）	HBM-SK-30/2	60 µg（2 × 30 µg）	¥77,000	凍
		HBM-SK-100/2	200 µg（2 × 100 µg）	¥102,000	凍
Lyophilized exosomes from HCT116 cell line	HCT116 細胞株（ヒト大腸がん）	HBM-HCT-30/2	60 µg（2 × 30 µg）	¥77,000	凍
		HBM-HCT-30/5	150 µg（5 × 30 µg）	¥166,000	凍
		HBM-HCT-100/2	200 µg（2 × 100 µg）	¥102,000	凍
		HBM-HCT-100/5	500 µg（5 × 100 µg）	¥202,000	凍
Lyophilized exosomes from PC3 cell culture supernatant	PC3 細胞株（ヒト前立腺腺がん　グレード IV）	HBM-PC3-30/2	60 µg（2 × 30 µg）	¥77,000	凍
		HBM-PC3-100/2	200 µg（2 × 100 µg）	¥102,000	凍
Lyophilized exosomes from A549 cell culture supernatant	A549 細胞株（肺がん）	HBM-A549-30/2	60 µg（2 × 30 µg）	¥77,000	凍
		HBM-A549-100/2	200 µg（2 × 100 µg）	¥102,000	凍
Lyophilized exosomes from K562 cell culture supernatant	K-562 細胞株（慢性骨髄性白血病（胸水））	HBM-K562-30/2	60 µg（2 × 30 µg）	¥77,000	凍
		HBM-K562-100/2	200 µg（2 × 100 µg）	¥102,000	凍

■カスタム品　その他の細胞株由来のエクソソームスタンダード

HansaBioMed 社では、ご要望に応じて、その他多くの細胞株から精製エクソソームスタンダードを調製してご提供いたします。コスモ・バイオの Web で取り扱い細胞株のリストをご覧いただけます。詳細についてはお問い合わせください。

WEB 記事ID 16252 検索

EVs・EVs 産生 ▶▶▶ EVs　　WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 34666

ヒト間葉系幹細胞（MSC）由来

zenbio Advanced Cell-Based Solutions & Services

組織工学や再生医療研究におすすめ

ヒト脂肪組織／胎盤／臍帯血　間葉系幹細胞由来のエクソソーム

Zen-Bio 社では、自社のヒト間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cell ; MSC）から調製したエクソソームをご用意しています。組織工学や再生医療研究におすすめです。

Quality Control：エクソソームを調製する細胞について、HIV-1、HIV-2、Hep-B、Hep-C および梅毒の陰性を確認しています。単離エクソソームについては、平均粒子径、タンパク質濃度、RNA 濃度および粒子数（particles/mL）を確認しています。

背景

生体内へ移植された細胞はほとんど生存しないことから、細胞治療の効果は細胞から分泌される因子に依る可能性が考えられます。パラクライン分泌の重要な鍵を握るのがエクソソームや細胞外小胞で、エクソソームは細胞内で形成され、細胞膜に融合後、細胞外に分泌されます。最近の研究では、前駆脂肪細胞由来のエクソソームが、*in vitro* 創傷治癒モデルにおいて細胞増殖を刺激することや、脂肪移植片由来のエクソソームが皮膚の再生やリモデリングに有用なことが示唆されています [1]。

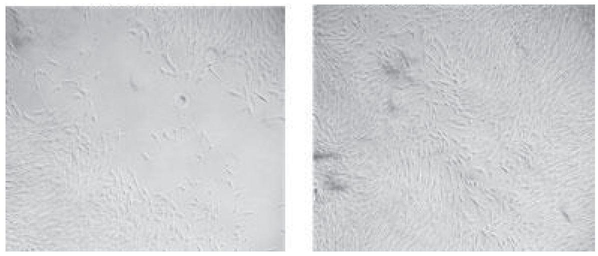


図　セルスクレーパーを用いて単層培養した線維芽細胞に傷をつけた後、細胞を洗浄し、DMEM+10% エクソソーム不含 FBS（コントロール）もしくは 25 μg の前駆脂肪細胞由来エクソソームを添加した DMEM+10% エクソソーム不含 FBS（エクソソーム処理）中で培養した。5 日間培養後、エクソソームを添加した群では、線維芽細胞の増殖により傷をつけた部位の隙間が埋まった。この結果から、前駆脂肪細胞（脂肪組織由来間葉系幹細胞）由来エクソソームに含まれる因子が細胞増殖を促進することにより、創傷治癒や組織再生に関与する可能性が考えられる。

参考文献

1) Pellon MA. Fat-graft derived exosomes: a promising tool for skin repair and remodeling. Poster presentation, Second International Meeting of ISEV (International Society of Extracellular Vesicles) 2013, Boston, USA, April 17th-20th, 2013

［Zen-Bio, Inc.　メーカー略号：ZEN］

品名	由来	品番	包装※	希望販売価格	貯蔵
Preadipocyte（Mesenchymal Stem Cell）Exosomes	ヒト脂肪組織	EXP-F100	1 vial	¥237,000	凍
Placental Derived Mesenchymal Stem Cell Exosomes	ヒト胎盤	EXPLMSC-F100	1 vial	¥292,000	凍
Cord Blood Serum Exosomes	ヒト臍帯血	EXCBS-F100	1 vial	¥310,000	凍

※ 1 vial（> 7 billion particles/vial）

EVs・EVs 産生 ▶▶▶ EVs　　WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 32953

ミルクエクソソーム

コスモ・バイオ株式会社

国産生乳由来のエクソソームです。健康な牛から採取された生乳から超遠心分離法によりエクソソーム画分を調製しています。*In vitro* から *in vivo* まで幅広い実験にご利用いただけます。

なお、本製品は以下の国立がん研究センター研究所分子細胞治療分野 吉岡祐亮先生の研究プロジェクトによる成果を応用して開発しました。

> 日本医療研究開発機構（AMED）
> 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
> 課　題　名：エクソソーム改変技術を用いた新規ドラッグデリバリーシステムの開発
> 研究代表者：吉岡祐亮 先生

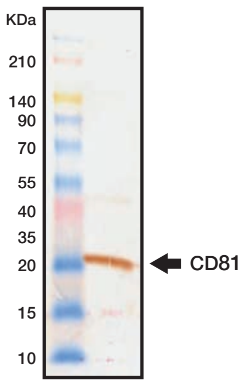


図 1　CD81 モノクローナル抗体を用いた Western Blotting
タンパク質量として 2 μg を用いて Anti CD81 モノクローナル抗体（品番：SHI-EXO-M03）で検出した。

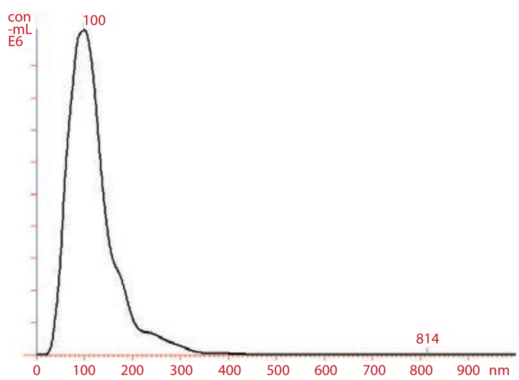


図 2　NanoSight を用いた粒度分布測定
Size Distribution：Mean：119 nm

本製品を使用した文献発表等

ご提供者 ： 東北大学大学院工学研究科
　　　　　プロセス要素工学講座 菅 恵嗣 先生

Insight into the Exosomal Membrane:
From Viewpoints of Membrane Fluidity and Polarity
Langmuir 2021, 37, 38, 11195–11202

［コスモ・バイオ株式会社　メーカー略号：CSR］

品名	種由来	濃度	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
牛乳由来エクソソーム	Bovine	タンパク質濃度：100 μg/mL PBS（ろ過滅菌済み）	EXBM100L	1 set（100 μL × 10 vials）	¥30,000	冷
			EXBM1000L	1 set（1 mL × 10 vials）	¥100,000	冷

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/cf-RNA 精製
その他
受託サービス

EVs・EVs 産生 ▸▸▸ EVs　記事 ID 検索 ▸▸▸ 33312

ミルクエクソソーム抗体

コスモ・バイオ株式会社

ウエスタンブロットに適用

本製品はウシミルクから超遠心法で精製したエクソソームを抗原として作製したポリクローナル抗体です。最近の研究ではエクソソームの性質を利用して、ドラッグデリバリー担体（DOS）としての研究もおこなわれており、とくに生乳由来のエクソソームは抗がん剤の経口投与手段としても注目されています[1]。

交差種	ウシ
アプリケーション	ウエスタンブロット
特異性	Whole Exosome of Bovine Milk
精製方法	硫酸アンモニウム沈殿（乳清タンパク質吸収処理済）
性状	PBS(-) 15 ppm Proclin 300
使用時推奨希釈率	ウエスタンブロット時　1/1,000

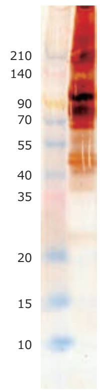


図　品番：EXO-AB-01 のウエスタンブロット

参考文献

1) Ashish K.Agrawal *et al*., *Nanomedicine*. 2017 Jul; 13(5) : 1627-1636.

［コスモ・バイオ株式会社　　メーカー略号：CAC］

品名	交差性	免疫動物	適用	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ウシミルクエクソソーム抗体	Bovine	Rabbit	WB	EXO-AB-01	100 µL（1 mg/mL）	¥30,000	凍

EVs・EVs 産生 ▸▸▸ EVs　記事 ID 検索 ▸▸▸ 34756

ヒト 母乳由来エクソソーム

コスモ・バイオ株式会社

母乳中のエクソソームの機能・作用メカニズムの研究に

健康なヒトから倫理的に適切な手続きを経て提供された母乳から、超遠心分離法によって調製したエクソソーム画分です。*In vitro* から *in vivo* まで幅広い実験にご利用いただけます。原料母乳は FDA の認める方法によって感染症（HIV-1、HCV、HBV by NAT、HBsAg、HCV Ab、HIV1 および 2Ab、RPR）に非感染であることが確認されています。

背景

エクソソームはヒト母乳にも存在し、CD63 や CD81 といったエクソソームマーカーを発現することがわかっています[1]。ヒト母乳中のエクソソームは多くの miRNA を内包しますが、なかでも免疫に関する miRNA が多く同定されており、これらの miRNA が母から乳児に移動する可能性が示唆されています[2]。ヒト母乳中エクソソームによる免疫細胞の制御についていくつかの報告がある[1]、[3] 一方で、ブタの乳由来のエクソソームでは、乳仔の腸管上皮細胞に対して直接増殖促進の機能を示すという報告もあり[4]、母乳中のエクソソームの機能やその作用メカニズムに関する研究が注目されています。

1) Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk, Charlotte A, *et al*., *J Immunol* August 1, 2007, 179 (3) 1969-1978.
2) microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk, N Kosaka, *et al*., *Silence*. 2010 Mar 1;1(1):7
3) Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4+ Tcells, Näslund TI *et al*., *AIDS*. 2014 Jan 14;28(2):171-80.
4) Porcine milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells, T Chen, *et al*., *Scienti_ c Reports* volume 6, Article number: 33862 (2016)

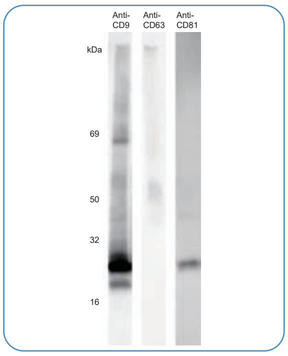


図 1　CD9, 63, 81 モノクローナル抗体を用いた Western Blotting
タンパク質量として 0.5 µg を用いて、Anti-CD9 モノクローナル抗体（品番：SHI-EXO-M01）、Anti-CD63 モノクローナル抗体（品番：SHI-EXO-M02）および Anti-CD81 モノクローナル抗体（品番：SHI-EXO-M03）で検出した。

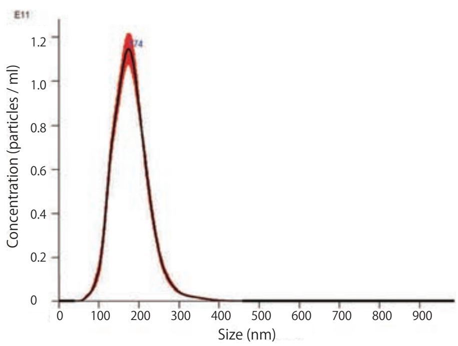


図 2　NanoSight を用いた粒度分布測定
本品を PBS で 200 倍希釈し、NanoSight LM10 で測定した。
平均粒度：179 nm
本品 1 mL あたりの粒子数：2.3 × 10^{12} Particles

［コスモ・バイオ株式会社　　メーカー略号：CSR］

品名	種由来	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Breast Milk Exosome	Human	EXHM100L	1 set（100 µL × 10 vials）	¥60,000	冷

エクソソーム粒子数はロットごとに異なります。製品に添付の CoA をご参照ください。

EGFP を発現させたエクソソーム　FLuoEVs

Hansa BioMed

蛍光を CD63 に発現させているので、安定性が高い

エクソソームの CD63 に EGFP（緑）を安定的に融合させた蛍光標識 EV です。蛍光の高い安定性を実証しているため、*in vitro* の追跡研究や、ナノ粒子の分析、アッセイのキャリブレーション用の参照材料としてご使用いただけます。

本商品は、CD63 との融合タンパク質として、蛍光タンパク質を発現できる HEK293 細胞からタンジェンシャル フロー フィルトレーション（TFF）とサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）の組み合わせによって、精製した細胞外小胞です。

特長

●粒子サイズ：50 ～ 120 nm
●EV を膜染色するより、蛍光色素を発現させているので、安定性が高い

アプリケーション

●細胞へのスパイクインと *in vitro* 追跡
●細胞へのスパイクイン時の定量用コントロール
●EV の取り込みのモニタリング
●EV アナライザー用の標準化されたポジティブコントロール
●フローサイトメトリー
●蛍光ナノトラッキング法

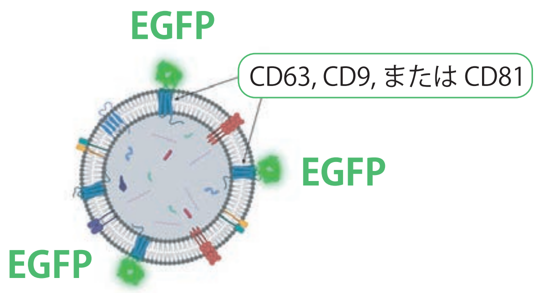


図 1

蛍光 NTA における FLuoEV のパフォーマンス（Zetaview アナライザー、Particle Metrix）

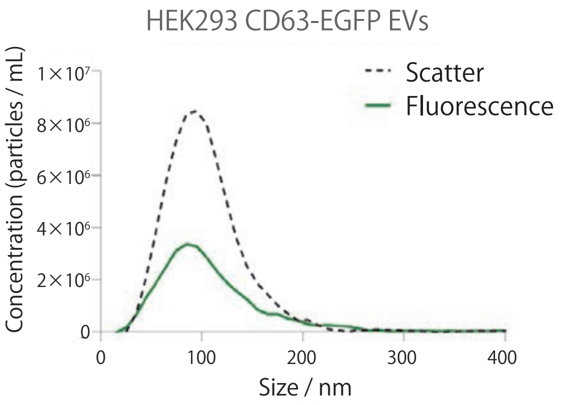


図 2　Scatter モードと蛍光モード（蛍光粒子の割合：40 ～ 60%）

フローサイトメトリーにおける FLuoEV のパフォーマンス（NanoAnalyzer、NanoFCM）

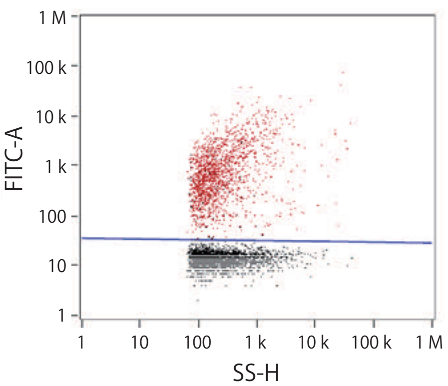


図 3

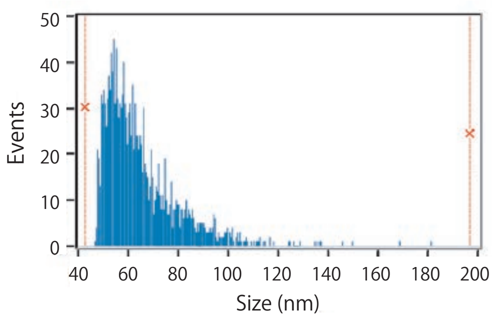


図 4

NanoAnalyzer NanoFCM による FLuoEV HEK293-CD63-EGFP（品番：HBM-HEK-EGFP）の分析（蛍光粒子の割合 60 ～ 80%）

[HansaBioMed OU　　メーカー略号：HNB]

品名	蛍光部位	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Lyophilized EGFP Fluorescent EVs from HEK293 cells (CD63-EGFP)	CD63-EGFP	HBM-HEK-EGFP	1 vial（1 × 10^9 fluorescent particles）	¥100,000	冷
Lyophilized EGFP Fluorescent EVs from HEK293 cells (CD9-EGFP)	CD9-EGFP	HBM-HEK-EGFP9	1 vial（1 × 10^9 fluorescent particles）	¥100,000	冷
Lyophilized EGFP Fluorescent EVs from HEK293 cells (CD81-EGFP)	CD81-EGFP	HBM-HEK-EFGP81	1 vial（1 × 10^9 fluorescent particles）	ご照会	冷

FBS Exosome Depletion Kit（Slurry Format+Column Format）

NORGEN BIOTEK CORP.

ウシ由来 miRNA を含まない FBS の調製に！

ウシ胎児血清（FBS）中のエクソソームを迅速かつ簡便に除去することができるキットです。

本商品でエクソソームを除去した FBS には、ウシ由来 miRNA が含まれず、通常の FBS 使用時と同等の細胞増殖をサポートします。本商品は、**120 ～ 240 mL の FBS サンプルからエクソソームを除去**することができます。Norgen 社独自の樹脂を用いており、従来法と比較して特別な装置や超遠心分離、沈殿試薬、プロテアーゼ処理を必要としません。市販されている高価なエクソソーム除去 FBS を使用するよりも安価にエクソソームを除去することができます。

構成内容

	Slurry Format	
	Kit I	Kit II
包装	6 プレップ	12 プレップ
ExoC バッファー	2 × 1.5 mL	8 mL
Slurry E	14.5 mL	2 × 14.5 mL

	Column Format	
	Kit I	Kit II
包装	6 プレップ	12 プレップ
ExoC バッファー	2 × 1.5 mL	8 mL
Maxi スピンカラム	6 本	12 本

仕様

	Kit I	Kit II
サンプル量	最大 140 mL	最大 280 mL
除去対象	エクソソームサイズの小胞	
ウシ miRNA	検出限界以下に除去	
6 回の精製にかかる時間	40 分	

背景

細胞培養で使用される培地は、多くの場合細胞の成長や増殖のために FBS を必要とします。FBS には、ウシ由来のエクソソーム小胞が大量に含まれており、このエクソソームは、細胞から放出されるエクソソームを研究する際の培養実験など特定の研究分野において信頼性の低下を招く要因となるため、エクソソーム除去 FBS の利用が推奨されています。

特長

●ウシ由来の miRNA を含まない FBS の調製に
●プロテアーゼ処理不要
●時間を要する超遠心分離不要
●ろ過、特別なシリンジ、沈殿試薬不要
●オーバーナイトインキュベーション不要
●エクソソーム除去 FBS は、通常の FBS と同等の細胞増殖率

使用例

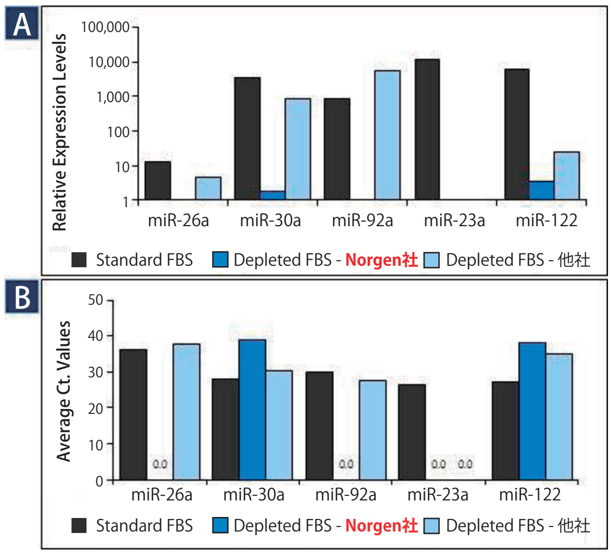


図 1　Slurry Format の商品を使用してエクソソームを除去した FBS 中の miRNA 量
本商品（品番：61200）を使用して、5 mL の FBS からエクソソームを除去後、市販の FBS ／エクソソーム除去 FBS とともに RNA を精製した。精製した RNA 5 µL を RT-qPCR のテンプレートとして使用し、5 種類のウシ miRNA（miR-26a, miR-30a, miR-92a, miR-23a, miR-122）の増幅を評価した。5 種類の内 3 種類（miR-26a, miR-92a, miR-23a）は増幅がみられず、残りの 2 種類（miR-30a、miR-122）は極めて高い ct 値を示したが、融解曲線によればプライマーダイマーであると考えられる。

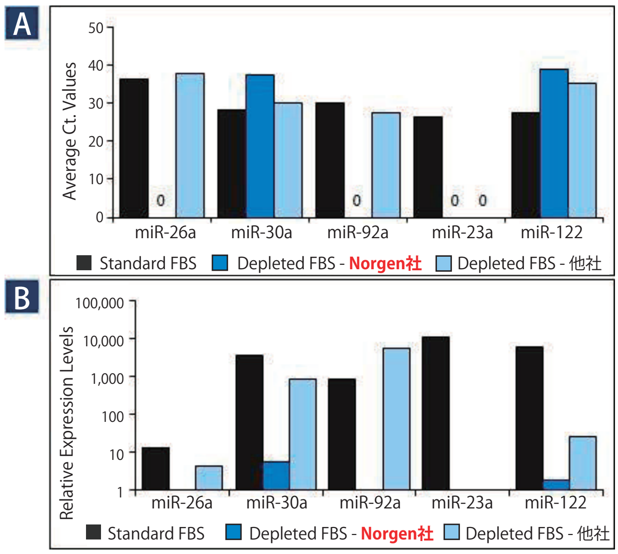


図 2　Column Format の商品を使用してエクソソームを除去した FBS 中の miRNA 量
本商品（品番：61200）を使用して、5 mL の FBS からエクソソームを除去後、市販の FBS ／エクソソーム除去 FBS とともに RNA を精製した。精製した RNA 5 µL を RT-qPCR のテンプレートとして使用し、5 種類のウシ miRNA（miR-26a, miR-30a, miR-92a, miR-23a, miR-122）の増幅を評価した。5 種類の内 3 種類（miR-26a, miR-92a, miR-23a）は増幅がみられず、残りの 2 種類（miR-30a、miR-122）は極めて高い ct 値を示したが、融解曲線によればプライマーダイマーであると考えられる。

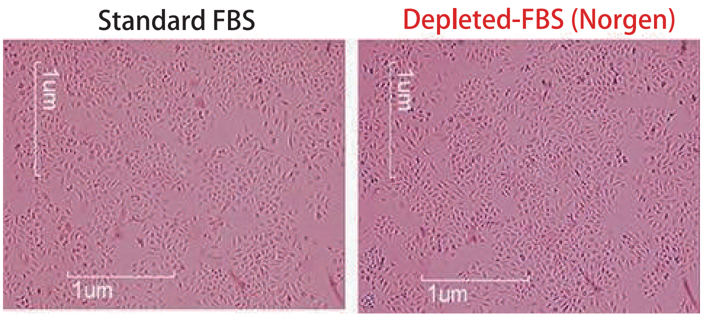


図 3　エクソソーム除去 FBS を使用した HeLa 細胞の増殖
本キットを用いたエクソソーム除去 FBS と標準 FBS の両方で、同一の細胞形態、同様の増殖が見られた。

［Norgen Biotek Corp.　　メーカー略号：NOG］

品名／内容	Web の記事 ID	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
FBS 中のエクソソームをスラリー（樹脂懸濁液）で除去するキットです。					
FBS Exosome Depletion Kit I-Slurry Format	16034	61100	140 mL（6 preps）	¥64,000	室
FBS Exosome Depletion Kit II-Slurry Format	16034	61400	280 mL（12 preps）	¥111,000	室
FBS 中のエクソソームをカラムベースで除去するキットです。					
FBS Exosome Depletion Kit I-Column Format	16033	61200	120 mL（6 preps）	¥68,000	室
FBS Exosome Depletion Kit II-Column Format	16033	61300	240 mL（12 preps）	¥130,000	室

凍結乾燥エクソソームスタンダード

Immunostep 社では細胞培養上清、ヒト血清などの様々なソースから分離された凍結乾燥エクソソームを取り扱っております。エクソソームは分画遠心法によって分離されています。

we know how
immunostep

特長

● すべてのバッチで、FCM、WB、NTA 分析を用いた検証が行われています。
● 凍結乾燥エクソソームのため、4℃保存が可能です。

詳細は
コチラから！

EVs の精製方法

コスモ・バイオで販売しているエクソソーム精製キットを合わせてご紹介

エクソソームや微小胞の単離は、エクソソーム分野の全ての研究者にとって主要なテーマです。近年エクソソーム単離において、様々な方法が検討されています。どのような実験にエクソソームを必要とするのかにより、回収量か純度のどちらを優先するか違いがあるため、それを念頭に入れて使用する方法をご選択ください。

■代表的な精製方法

精製方法	方法	特徴	対応商品
超遠心分離法 網羅的なエクソソームの回収・解析に	溶液中に存在する一定の大きさや密度の粒子を、遠心により沈降させる。最もシンプルな方法。	EV を高回収率で得られるが、EV 以外の画分も含まれる。培養液中の EV の miRNA 解析やタンパク質解析をする場合などに利用できる※。 ※培養に用いる FBS 中の EV に注意する必要もある。	—
密度勾配遠心法	途中のペレットダウン法で得られた EV 画分を、密度勾配のあるスクロース液やイオジキサノール液で再度超遠心分離する方法。	浮遊密度の違いにより分離でき、極めて純度の高いエクソソームの精製が可能。しかし、圧力によってエクソソームが多少破壊され[1) 2)]、回収率は低下する[3) 4)]。また、血清試料を用いた場合には、アルブミン、IgG、プロテオソーム等のタンパク質が混入してしまう。	OptiPrep™ （44 ページ参照）
抗体アフィニティー法、免疫沈降法	エクソソーム抗体をコートしたラテックスや磁気ビーズを用いた、速くて簡単な手法。	目的のマーカーを持つエクソソームを高純度で得られる。マイクロベシクルとの分離も可能。しかし、マーカーを発現しないエクソソームは捕捉できず、網羅解析には向かない。回収後のエクソソームと抗体の結合が強固なため、厳しい条件での解離が必要で、インタクトなエクソソームの単離は困難（**Fab-TACS® のように、ラベルフリーのエクソソームが得られるよう、工夫のある商品も存在する**）。	ExoTrap™ （45 ページ参照） Fab-TACS® （47 ページ参照）
ポリマー沈殿法	親水性ポリマー（PEG など）の添加により EV 表面の水分を奪って凝集を促進させ、低速遠心でポリマーと EV の共沈殿物を回収する方法。	親水性ポリマーはエクソソーム以外のタンパク質も一緒に取り込み沈殿するため、純度はあまり高くない。ポリマーとエクソソームは一つの凝集体として沈殿するため、下流実験に影響を及ぼす可能性がある。（Exo-Prep など、商品により精製したエクソソームの活用範囲が広いものもある）	Exo-Prep （49 ページ参照）
サイズ排除クロマトグラフィー法（SEC 法）	粒子のサイズによる分画方法。カラムの通過は大きなサイズの粒子ほど速く、小さな粒子ほど遅くなることを利用する。	少量の検体からの単離に適しているが、大容量には不向き。得られる EV は高純度だが、濃度は低くなる傾向にある。エクソソームとマイクロベシクルの分離は難しい。	PURE-EV （50 ページ参照）
タンジェンシャルフローろ過（TFF）法	メンブレン面に対して平行方向にサンプルを還流させ、メンブレンへの粒子の堆積を防ぎながらサイズ分画する方法。	サンプルの精製と濃縮を同時に行うことが可能。直接的なろ過と比較しサンプルに対する負荷が少なく、10 mL 程度から 10 L 程度までの範囲のサンプルをろ過できる。水分量を減らす濃縮もできる。EV 単離前の、細胞培養上清や尿の低濃度マトリックスの濃縮としても用いる。	TFF-Evs TFF-Easy （51 ページ～参照）

■エクソソーム単離法のまとめ

手法	純度	収量、回収率	所要時間 （+ が多いと時間かかる）
超遠心分離法	++++	++	+++++
抗体アフィニティー、免疫沈降法	+++	++	++
ポリマー沈降法	++	+++	+
サイズ排除クロマトグラフィー法（SEC 法）	++++ （ただし、同じサイズのマイクロベシクルやリポタンパク質の分離は不得意）	+++	+
TFF 法	++++	+++	+
イオン交換法	++	+	+++

※本表は、HansaBiomed 社からの情報やコメントを元に制作いたしました。TFF 法につきましては、Sara Busatto らの論文[7)]も参考にしました。
※コスモ・バイオの考えのもと、RNA 分析用、タンパク質分析用など、精製したエクソソームの使用用途を限定しており、NanoSight 解析（NTA）ができない商品は、精製したエクソソームは「インタクトではない」としています。エクソソーム単離キットを販売する主要なメーカーには確認を取っておりますが、同じ手法を取るすべての商品において、メーカーの主張と同じであるとは限りません。
※サイズ排除クロマトグラフィー法で精製した後に、さらに精度を上げるためには、イオン交換法を追加するなどの方法もあります[6)]。
※ポリマー沈降法は、典型的なものでしたら書かれている評価になりますが、メーカーの開発によりタンパク質プロファイリングが可能な商品もあります。

■その他の精製方法

精製方法	方法	特徴	商品
イオン交換法	負の荷電でエクソソームを精製する方法。	安価、そして簡単な操作で短時間に回収できるが、エクソソームの他にマイクロベシクルも精製する。	EV-Capture™ （53ページ参照）
101 Bio社独自方法	メーカー独自の非公開方法。	3つの溶液とカラムを使用。タンパク質夾雑物を除去し、95%の高純度でエクソソームを単離できる。	PureExo® （55ページ参照） DiagExo® （60ページ参照）
炭化ケイ素樹脂（SiC）法 （Norgen社独自方法）	特定のpHにおいてエクソソームを捕獲する炭化ケイ素樹脂を使用する方法。 （Norgen社が特許を持つ）	操作も短時間で済み、NanoSight®または電子顕微鏡を用いて粒子サイズおよび濃度の分析、エクソソームRNAの発現解析ができる。	Norgen社商品 （62ページ参照）
細胞外小胞に含まれるグリコサミノグリカンとの相互作用	Glypican-1等のグリコサミノグリカンががん由来のエクソソームに高発現しており、それがリガンドになることを活用した方法。	がん研究のリキッドバイオプシー研究に有用。	evGAG※ （111ページ参照）

※第3章の「リキッドバイオプシー」でご紹介しています。

参考文献

1) Coumans, F.A.W. *et al*. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ. Res*. 2017, 120, 1632–1648.
2) Ismail, N. *et al*. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* 2013, 121, 984–995.
3) Théry, C. *et al*. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* 2018, 7, 1535750.
4) Baranyai, T. *et al*. Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods. PLoS ONE 2015, 10, e0145686.
5) Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. Biomed Res Int. 2018; 2018:8545347.
6) J. Van Deun *et al*., "Integrated Dual-Mode Chromatography to Enrich Extracellular Vesicles from Plasma", adv. Biosyst., 2020, 1900310.
7) Sara Busatto et al. Tangential Flow Filtration for Highly Efficient Concentration of Extracellular Vesicles from Large Volumes of Fluid. *Cells* 2018, 7(12), 273; https://doi.org/10.3390/cells7120273.

簡便性	インタクト	タンパク質プロファイリングへの適用	核酸プロファイリングへの適用
+	△	++++	++++
+++	×（商品により異なる） （エクソソームと抗体とを解離させてインタクトな状態のエクソソームを得るのは難しい商品が多い。）	+++	++++
+++	○	++ 向かないという意見もある[5)]	++++
++++	○	++++	++++
++++	○	++++	++++
+++	○	―（向かない）	―（向かない）

OptiPrep™（オプティプレップ）多用途密度勾配遠心分離媒体

serumwerk bernburg

エクソソーム分離の理想的なソリューション

サンプルあります　引用文献 4,000 報以上！

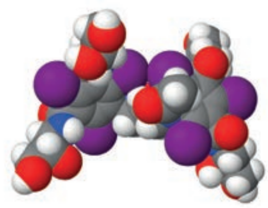
細胞など様々なサンプルの分離に

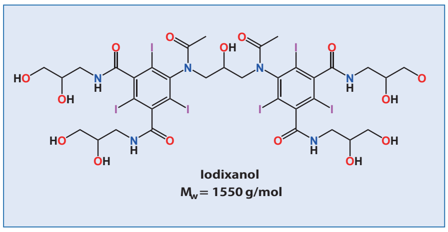
特長

- ●エクソソーム等の膜小胞や細胞の単離におすすめ
- ●ショ糖と比較して粘度が低く、取り扱いが容易
- ●細胞に対し、非常に低毒性
- ●ISO13485 に準拠した製造、滅菌済

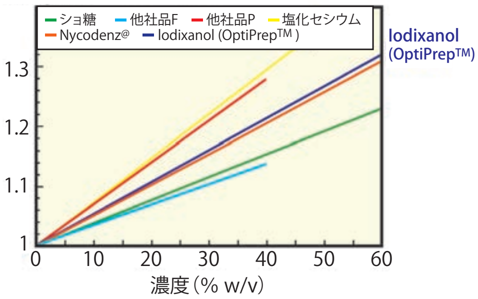
性状

- ●60％（w/v）Iodixanol 水溶液
- ●密度：1.320 ± 0.001 g/mL（20℃）
- ●エンドトキシン：＜ 1.0 IU/mL

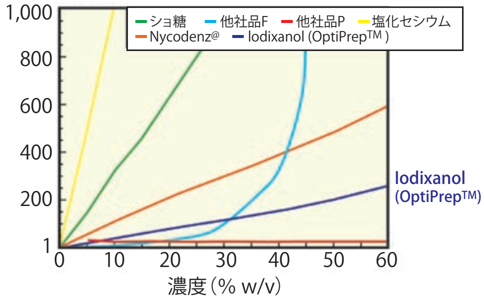




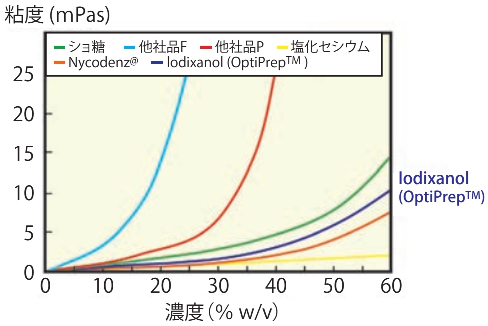
Iodixanol と他の密度勾配溶質の性質



各密度勾配溶質の溶液濃度と密度との関係
他社品 P や他社品 F は作製できる密度に制限があるが、Iodixanol は 1.3 g/mL 程度まで幅広く密度を調製できる。



各密度勾配溶質の溶液濃度と浸透圧との関係
塩化セシウムやショ糖溶液は低濃度でも浸透圧が高くなってしまい、目的分子から水分が奪われ分子の安定性に影響を与える可能性がある。また、他社品 F は 30 ～ 40% にかけて曲線的に浸透圧が変化してしまう。一方、Iodixanol は溶液濃度と浸透圧との関係が比例関係にあり、高濃度溶液でも浸透圧が適度に保たれている。



各密度勾配溶質の溶液濃度と粘度との関係
他社品 P や他社品 F は低濃度でも高い粘度を示すが、ショ糖や Iodixanol はそれに比べ粘度が低い。

図　Iodixanol と他の密度勾配溶質の性質

技術情報あります

本ハンドブックの最後に OptiPrep™ などの密度勾配遠心媒体を用いる方法や注意点などの様々な情報を掲載しています。

■サンプルは Web へ

本商品を紹介するコスモ・バイオのWeb から無料サンプルをご請求いただけます。

WEB 記事ID 1797 検索

■詳細は Web へ

各種プロトコールやエクソソーム精製のミニレビュー、文献情報は Web より閲覧可能です。 記事ID 1797 検索

ご用意のあるプロトコール例

- ●血球・培養細胞
- ●細胞内小器官・膜小胞
- ●高分子・リポタンパク質
- ●カーボンナノチューブ
- ●原核生物・真核生物
- ●ウイルス

［Serumwerk Bernburg AG　　メーカー略号：SEW］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
OptiPrep™	1893	250 mL	¥28,000	室

ExoTrap™ Exosome Isolation Spin Column Kit

コスモ・バイオ株式会社

スピンカラムタイプのエクソソーム単離キット

スピンカラムにエクソソームマーカーとして知られているヒト CD9 抗体を固相化し、ヒト血清、血漿、唾液、尿、培養上清から **30 分以内でウエスタンブロット、質量分析などのタンパク質研究に使用できるエクソソーム由来タンパク質を単離**することができます。
＊ 特許一部成立済み

特長

●血清、血漿、尿、唾液、培養上清（全てヒトサンプルのみで試験済み）から高純度なエクソソーム由来のタンパク質を 30 分以内で単離
●使いやすいスピンカラムタイプ

研究者が使ってみました！
Application Note
あります！

ウイルス感染細胞とエクソソームを扱うアプリケーションノートを次ページでご紹介しています。

WEB 記事ID 33910 検索

血清、血漿サンプルからの精製プロトコール

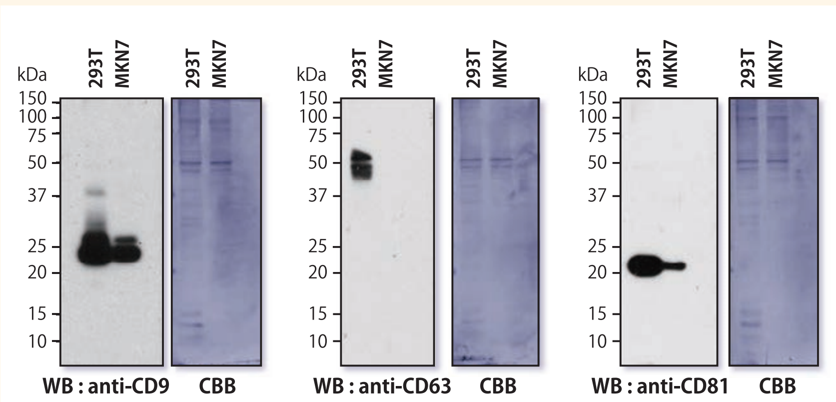
1. 血清、血漿を PBS で 6 倍希釈し、12,000 rpm、4℃、15 min 遠心する。
2. 0.22 μm のフィルターで上清をろ過し、新しいチューブに回収する。
3. ExoTrap™ の上下のキャップを開封し、1.7 mL チューブにカラムをセットし、5,000 rpm、20℃、1 min 遠心して保存液を捨てる。
4. サンプル 600 μL をカラムにアプライし、5,000 rpm、20℃、1 min 遠心し、フロースルーを除去する。
5. ❹を必要回数繰り返す。（この実験例では EDTA 血漿 200 μL を 6 倍希釈し、2 回繰り返した）
6. PBS 600 μL をカラムにアプライし、5,000 rpm、20℃、1 min 遠心し、フロースルーを除去する。
7. ❻をもう一度繰り返してカラムを洗浄する。
8. カラムを新しい 1.7 mL チューブに乗せ換える。
9. 各種アプリケーションに適した溶出バッファーをカラムのフィルタ部分にアプライする。
10. 37℃、30 min インキュベートする。
11. 7,500 rpm、20℃、1 min 遠心してサンプルを回収する。

細胞培養上清、尿、脳脊髄液などタンパク質濃度が低いサンプルには別のプロトコールを用います。

ウエスタンブロットによる実験例

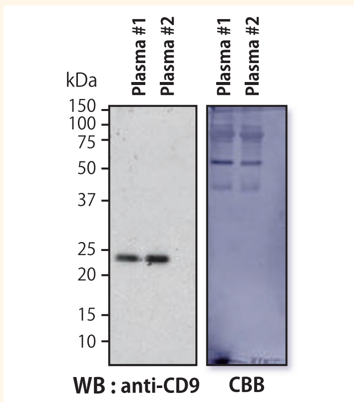
ExoTrap™ を使用して SDS サンプルバッファー 50 μL にてエクソソーム由来タンパク質を回収後、ウエスタンブロットにてエクソソームマーカーの発現を確認した。

1. 培養上清からのエクソソーム単離



サンプル：293T 細胞培養上清、MKN7 細胞培養上清
一次抗体：Anti CD9（品番：SHI-EXO-M01）、Anti CD63（品番：SHI-EXO-M02）、Anti CD81（品番：SHI-EXO-M03）
アプライ量：20 μL/レーン

2. ヒト血漿からのエクソソーム単離



サンプル：ヒト血漿 EDTA 処理
一次抗体：Anti CD9（品番：SHI-EXO-M01）
アプライ量：20 μL/レーン

製品使用文献

1) Yoshitaka S. (2017) Elimination of LMP1-expressing cells from a monolayer of gastric cancer AGS cells, *Oncotarget*., 8(24): 39345-39355. PMCID: PMC5503617
2) Tsuda S. (2017) Novel mechanism of regulation of the 5-lipoxygenase/leukotriene B4 pathway by high-density lipoprotein in macrophages, *Sci Rep*., 7(1):12989. PMCID: PMC5636875

ご準備いただくもの（その他必要なもの）

●1.7 mL チューブ（ビーエム機器 品番：BM4017 推奨）
●PBS　●溶出バッファー　●シリンジ
●0.22 μm ディスクフィルタまたは 0.22 μm スピンフィルタチューブ

［コスモ・バイオ株式会社　メーカー略号：CSR］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ExoTrap™ Exosome Isolation Spin Column Kit for Protein Research	SHI-EXO-K010	10 prep.	￥57,000	冷

研究者が使ってみました！

Application Note

あぷりけーしょんのーと

ExoTrap Exosome Isolation Spin Column Kit for protein research

ユーザーレポート

佐藤 好隆　Yoshitaka Sato

名古屋大学大学院医学系研究科
総合医学専攻　ウイルス学分野

Products

- ExoTrap™ Exosome Isolation Spin Column Kit for Protein Research
  品番：SHI-EXO-K010　メーカー：コスモ・バイオ株式会社　メーカー略号：CSR

エクソソーム (Exosome) は様々な細胞から分泌される脂質二重膜に囲まれた直径 30〜100 nm の膜小胞体で、タンパク質や核酸などを内包しています。体液中を循環することで、離れた場所にある細胞に様々なシグナルを伝えることが可能です。このエクソソームを介した細胞間のコミュニケーションは、抗原提示、アポトーシス、炎症、腫瘍の進展・悪性化などとの関連が指摘され、がん細胞から分泌されるエクソソームによるがんの早期診断やエクソソーム自体を Cargo としたドラッグデリバリーシステムの開発など分野を超えた応用に期待されています。

私たちはウイルス感染細胞とその周りに存在する非感染細胞の相互作用に興味を持って研究をしています。あるウイルスタンパク質を発現させた細胞とそのタンパク質を発現させていない細胞を混合培養し、蛍光免疫染色でウイルスタンパク質を検出すると、ウイルスタンパク質発現細胞の周囲の細胞（ウイルスタンパク質非発現細胞）にもウイルスタンパク質がドット状に検出されました。このことから、細胞間コミュニケーションを介在する分子としてエクソソームに興味を持ちました。

さて、実際に研究を進めていく上で、「どのようにエクソソームを精製するか？」が問題となりました。エクソソームの存在は知っていましたが、実際に扱ったことはありません。一般的には超遠心でエクソソームを精製するのですが、様々な条件や多くのサンプルからエクソソームを比較するには、時間と操作性で問題があります。そこで、操作の簡便さ（だれでも精製出来る）・精製に掛かる時間（短時間で精製出来る）・アプリケーションの豊富さ（エクソソーム自体も、内包されるタンパク質や核酸も解析できる）という視点で、各社から発売されているキットを検討し、”ExoTrap Exosome Isolation Spin Column Kit for protein research” を見つけました。

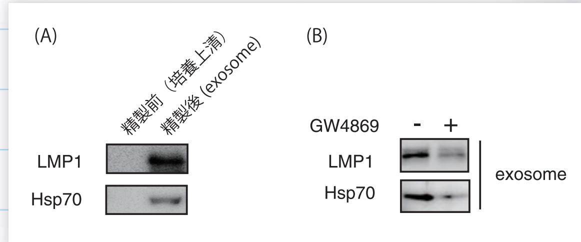


図 1: エクソソーム精製前後およびエクソソーム分泌阻害剤投与前後のウェスタンブロッティング
(A) ExoTrap™ Exosome Isolation Spin Column Kit を用いてエクソソームを精製後、エクソソームに内包される LMP1 および Hsp70 の発現量を WB により比較した。精製後の WB では LMP1 および Hsp70 が濃縮されていることがわかる。
(B) エクソソーム阻害剤 (GW4869) 処理した細胞培養上清から ExoTrap™ Exosome Isolation Spin Column Kit を用いてエクソソームを精製し、LMP1 および Hsp70 の発現量を WB により比較した。GW4869 処理により LMP1 および Hsp70 が減少し、これらのタンパク質がエクソソームに内包されていることがわかる。

本製品の最大の利点は、少量のサンプルをカラムにアプライし、遠心するだけという” 簡便さ” と、わずか 30 分という ” 短時間” でエクソソームが精製出来るということです。エクソソーム初心者だった私たちは本製品を使うことで、培養上清（精製前）では検出感度以下のため検出出来なかったエクソソームに内包されるウイルスタンパク質が、カラム精製後のサンプルでは WB でしっかりと検出されることを示すことが出来ました。さらに、エクソソーム阻害剤 (GW4869) 処理した細胞の培養上清からカラム精製したものでは、このウイルスタンパク質は検出されず、エクソソームに内包されていることが確認できました（Sato et al., Oncotarget, 8; 39345-39355, 2017）。多量のエクソソームを安価にという目的には不向きかもしれませんが、本製品はエクソソームを短時間に簡便に精製するという場合には強くお勧めです。

詳しい情報は、前の 45 ページへ

敬称は省略させていただきます

CD9/CD81 Fab-TACS® Exosome Agarose Column Starter Kit

iba Solutions For Life Sciences

CD9+ や CD81+ エクソソームをラベルフリーで単離可能

細胞培養液、血清や血漿から、CD81+ もしくは CD9+ のエクソソームを**ラベルフリーで精製**できます。

本商品で用いる Fab-TACS® は、低親和性の Fab フラグメントを用いたイムノアフィニティクロマトグラフィーの代替法です。Fab フラグメントはエクソソームの表面タンパク質と結合しますが、**ビオチンの添加後に自発的に解離します（Strep-tag® 技術）**。分離されたエクソソームは完全にラベルフリーで機能的であり、様々なダウンストリームアプリケーションに適しています。

ウエスタンブロット以外にも nanoparticle tracking analyses（NTA）、細胞培養実験等に適しています。

特長

- ●高純度
- ●ターゲットへの可逆的な結合
- ●完全な機能を保持したエクソソームを精製
- ●低親和性 Fab fragment によるラベルフリーなエクソソーム精製
- ●短時間かつシンプルなプロトコール

ラベルフリーで精製できる理由

Twin-Strep-tag® は、人工ストレプトアビジンである Strep-Tactin® と Fab-Strep の両方に結合し、２つを繋げます。Strep-Tactin® でコーティングしたアガロースマクロビーズを含むカラムに、Fab-Strep をロードすることで、アフィニティクロマトグラフィーを使用したエクソソーム精製が可能です。

また、Fab-TACS® 法は、Fab-Strep の低親和性と Twin-Strep-tag® と Strep-Tactin® の可逆的な結合という二つの要因によって、**すべての標識試薬が除去可能**です。

Fab fragment は、ターゲットとのみ弱く結合するため、エクソソームと十分に結合するためには、カラム内での Strep-Tactin® と Fab-Streps の多量体形成によって avidity（結合力）をあげることが必要です。この反応はビオチン添加によって巻き戻されます。ビオチンと Strep-Tactin® の親和性が高いため、ビオチンは Twin-Strep-Tag® に代わり Strep-Tactin® に結合します。これにより、Fab-Strep と共にエクソソームが解離します。更に、**Fab-Strep はエクソソームとの親和性が低いためエクソソーム表面から自然に解離し、その結果、完全にラベルフリーのエクソソームが得られます**。

ラベルフリー精製のための Strep-tag® 技術

Strep-tag® 技術では、アフィニティクロマトグラフィー精製であるにもかかわらず、ラベルフリーのエクソソーム精製を可能にします。

ラベルフリーの実現のために、Strep-tag® 技術ではエクソソーム精製用の「Fab-TACS®」法と呼ばれる、トレースレスのアフィニティエクソソーム単離方法を使用します。Fab-TACS® 法で使用する抗体由来の Fab フラグメントから派生した「Fab」は、Twin-Strep-tag® と結合して Fab-Strep（図 1）となり、もう一方で精製時にエクソソーム表面マーカーに特異的に結合したり、回収時には離れさせることができます（低親和性の結合）（図 1）。

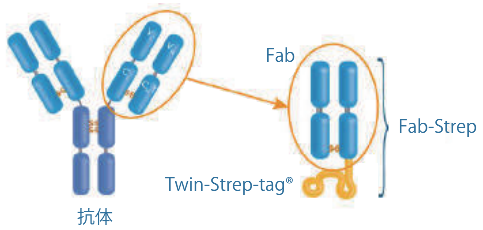


図 1　FAB-TACS® 法で用いる Fab-Strep の構造

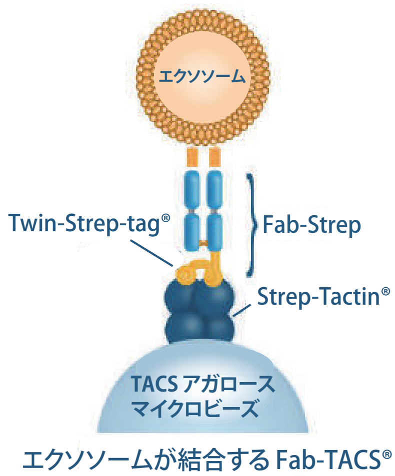


図 2　Fab-TACS® の構造、およびエクソソームとカラムのマイクロビーズの結合方法

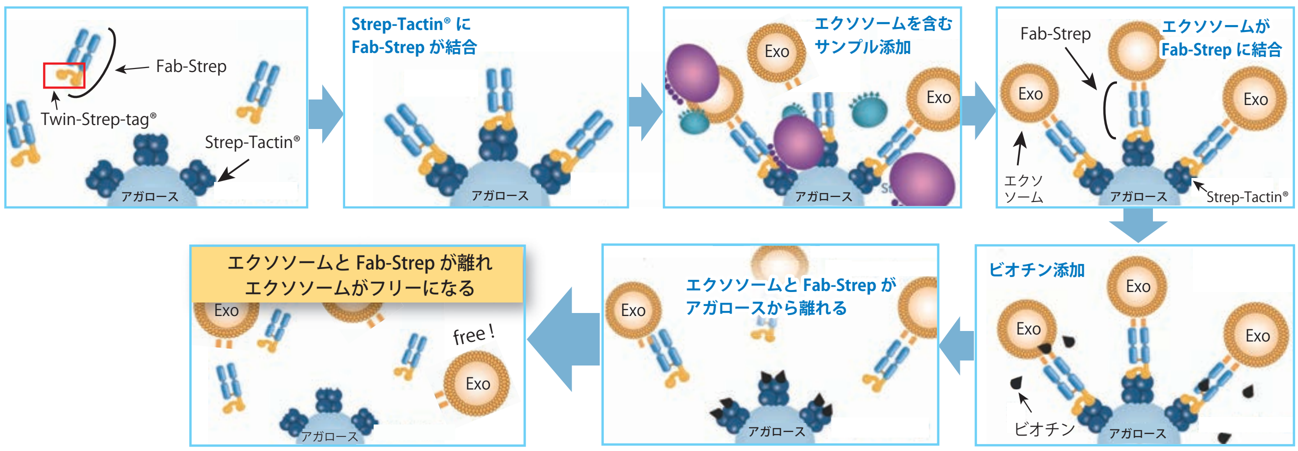
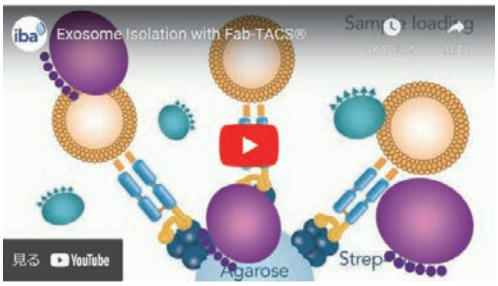


図 3　ラベルフリー精製の流れ

次のページへ続く

Fab-TACS® 技術によるエクソソーム単離方法を動画でご確認いただけます。



■ Fab-TACS Exosome Agarose column Starter Kit

血漿、血清、細胞培養上清からヒト CD9⁺（品番：6-3319-002）もしくは CD81⁺（品番：6-3381-002）エクソソームをラベルフリーで単離することができるキットです。

構成内容

- ●Strep-Tactin® TACS アガロースカラム※ 0.3 mL（2x）
- ●CD9 Fab-Strep, human（品番：6-3319-002）または CD81 Fab-Strep, human（品番：6-3381-002）
- ●ビオチンのストック溶液　●TACS カラムアダプター

※単品でも販売しています（品番：6-6310-300）。

[IBA GmbH　メーカー略号：IBA]

品名	適応サンプル種	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CD9 Fab-TACS® Exosome Agarose column Starter Kit	Human	6-3319-002	1 kit（2～3×10⁹ exosomes per column（sample-dependent））	¥45,000	㊄
CD81 Fab-TACS® Exosome Agarose column Starter Kit	Human	6-3381-002	1 kit（2～3×10⁹ exosomes per column（sample-dependent））	¥45,000	㊄

■ 関連商品　Strep-Tactin® TACS Agarose Column

ストレプトアビジンバリアントの Strep-Tactin® でコーティングされたアガロースマクロビーズを使用したカラムでしす。特殊な架橋により、細胞の分離や除去などに使用することができます。本カラムは、トレースレスの細胞アフィニティー精製（Fab-TACS®/Nano-TACS®）用に開発されました。この方法は、Twin-Strep-tag®（Fab-Streps）の他に、ナノボディ（Nano-Streps）と融合した Fab フラグメントを用いることができます。細胞を特異的に捕捉した後、ビオチン添加により Fab-/Nano-Strep は Strep-Tactin® アガロースから放出されます。細胞は Fab-/Nano-Strep と解離し、ダウンストリームアプリケーションに適した状態になります。<u>この原理はエクソソームの分離にも使用可能です</u>。

Fab-Strep/Nano-Strep の代わりに、Twin-Strep タグ付き抗体、デスチオビオチン化抗体、ビオチン化抗体（不可逆的結合）をカラムにロードすることも可能です。これにより、Strep-Tactin® TACS Agarose カラムはネガティブセルセレクションやデプリーションアプローチにも適しています。

仕様

- ●細胞結合限界：2 × 10⁷（品番：6-6310-300）or 1 × 10⁸（品番：6-6310-001）target cells
- ●ご提供形態：Pre-packed in buffer
- ●アプリケーション：アフィニティクロマトグラフィー or エクソソーム精製
- ●支持体：Crosslinked agarose

[IBA GmbH　メーカー略号：IBA]

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Strep-Tactin® TACS Agarose Column	6-6310-300	0.3 mL	¥17,000	㊄
	6-6310-001	1 mL	¥34,000	㊄

■ 関連商品　Strep-Tactin® TACS Agarose

カラムアフィニティクロマトグラフィーに最適化されているため、懸濁液はグラビティフローカラムの充填に使用することができます。1 mL の樹脂床容積のカラムに充填するには、2 mL の 50% 懸濁液が必要です。

仕様

- ●ビオチン結合限界：> 40 nmol/mL resin
- ●ご提供形態：50% 懸濁液
- ●アプリケーション：アフィニティクロマトグラフィー or エクソソーム精製
- ●支持体：Crosslinked agarose

[IBA GmbH　メーカー略号：IBA]

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Strep-Tactin® TACS Agarose	6-6350-002	4 mL	¥41,000	㊄
	6-6350-010	20 mL	¥126,000	㊄
	6-6350-025	50 mL	¥285,000	㊄

■ 関連商品　Fab-Strep、Elution Buffer

[IBA GmbH　メーカー略号：IBA]

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CD9 Fab-Strep	6-8019-150	50 µg	¥12,000	㊄
CD81 Fab-Strep	6-8015-150	50 µg	¥12,000	㊄
100 mM Biotin stock solution	6-6325-001	1 mL	¥14,000	㊄

エクソソーム単離キット EXO-Prep

HansaBioMed

血漿、血清、尿や細胞培養上清からワンステップで単離

生体液（血漿、血清、尿など）または細胞培養上清から、たった 1 回インキュベートするだけで、エクソソームを単離できるキットです。サンプルに EXO-Prep を加えて 1 時間インキュベートした後、1 回遠心してエクソソームのペレットを回収し､1X PBSに再懸濁します｡可溶化したエクソソームは、タンパク質／ miRNA を含む核酸バイオマーカープロファイリング、ナノ粒子トラッキング解析（NTA）、電子顕微鏡解析などにご使用いただけます。

図 1　プロトコール

特長

- ●短時間でエクソソーム単離
- ●超遠心不要
- ●簡単で迅速な手順
- ●臨床検体、細胞培養上清からエクソソームを単離
- ●少量のサンプルからも単離可能
- ●タンパク質プロファイリングに最適
- ●エクソソームに含まれる核酸（miRNA を含む）の抽出・プロファイリングに最適

特徴		
血漿からのエクソソームの単離	トロンビンで前処理	不要
	ペレットの可溶化	簡単
最小サンプル量		100 µL
インタクトなエクソソームを単離することができ、ELISA に適している		○
核酸抽出・解析に適している		○

アプリケーション

■ ELISA

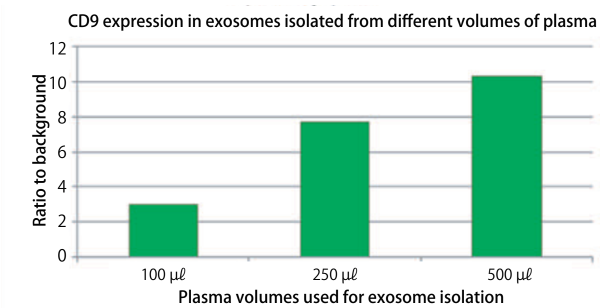


図 2　ELISA
EXO-Prep で単離したエクソソームは、ELISA を用いたタンパク質プロファイリングに適している。ELISA には、ヒト血漿中のエクソソームを捕捉（キャプチャー）する、エクソソーム捕捉用イムノプレート（品番：HBM-POF-CC）を用いた。

■ ウエスタンブロット

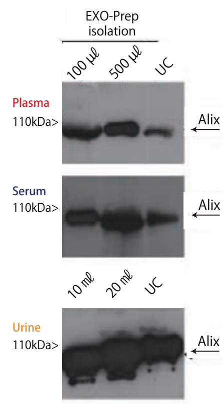


図 3　ウエスタンブロット
EXO-Prep を用いて、100/500 µL の血漿･血清、および 10/20 mL の尿からエクソソームを単離し、タンパク質ライセート（30 µg）中のエクソソームマーカー Alix を検出した。超遠心（UC）によって精製したエクソソームのタンパク質ライセート（30 µg）をコントロールとした。

■ トータル RNA 抽出および miRNA 発現プロファイリング

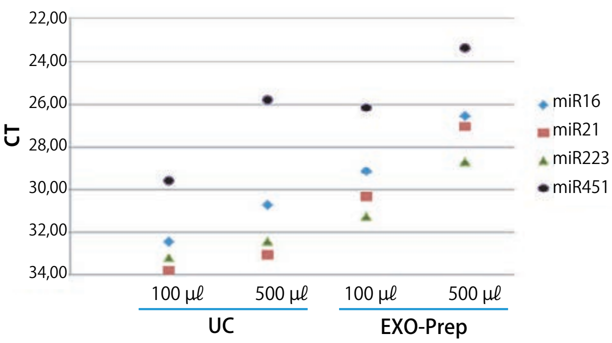


図 4　トータル RNA 抽出および miRNA 発現プロファイリング
EXO-Prep または超遠心により、100/500 µL の血漿から単離したエクソソームを使用して、トータル RNA の抽出、および、4 種類のエクソソーム miRNA のプロファイリングを行った。
超遠心により同量の血漿から精製したエクソソームと比較すると、EXO-Prep を用いて単離したエクソソームには、より多くの miRNA が含まれていた。

■ ナノ粒子トラッキング解析（Nano Tracking Analysis：NTA）

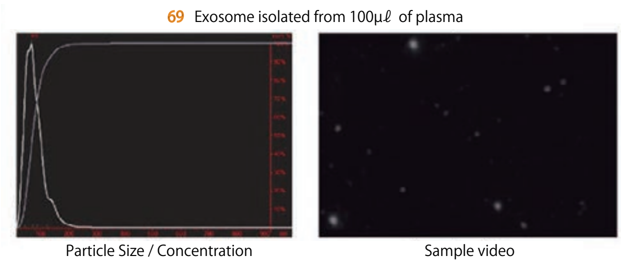


図 5　ナノ粒子トラッキング解析（Nano Tracking Analysis：NTA）
EXO-Prep で単離し、1X PBS 100 µL に再懸濁したエクソソームを用いて、ナノ粒子トラッキング解析（NTA）を行った。粒子のサイズは、エクソソーム小胞のサイズ（50 ～ 120 nm）に対応していた。

[HansaBioMed OU　　メーカー略号：HNB]

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
EXO-Prep : isolation from biofluids（plasma, serum）	HBM-EXP-B5	5 mL	¥73,000	冷
EXO-Prep : isolation from cell culture supernatants	HBM-EXP-C25	25 mL（25 rxns）	¥93,000	冷
EXO-Prep : isolation from urine	HBM-EXP-U25	30 mL（25 rxns）	¥93,000	冷

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/ cf-RNA 精製
その他
受託サービス

EVs 精製 ▶▶▶ サイズ排除クロマトグラフィー
WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 17679

サイズ排除クロマトグラフィーカラム PURE-EV

Hansa BioMed

エクソソームおよび細胞外小胞を生体液や細胞培養上清から分離！

サイズ排除クロマトグラフィー法により生体液や細胞培養上清からエクソソームおよび細胞外小胞を分離・精製する商品です。

サイズ排除クロマトグラフィー法は複合マトリックスからエクソソームおよび細胞外小胞を分離・精製する有用な手段の1つです。特にこの手法は、血中タンパク質からのエクソソーム分離に非常に効果的で、さらに小胞の形状や機能に影響を与えることはありません。

特長

- ●生体液や細胞培養上清からエクソソームを分離
- ●分離処理した細胞外小胞を精製
- ●分離したエクソソームは様々な解析に使用可能
- ●速くて容易　●少量サンプルに適用
- ●1つのカラムを5回まで再利用可能
  カラムを再利用する場合、カラムを1×PBS（pH7.4）20～30 mL で洗浄してください。

商品データ

エクソソーム量およびトータルタンパク質量の測定

まず、PURE-EV カラムをヒトの血漿 1 mL で流します。合計 24 分画（各 500 μL）を回収し、各分画を用いた ExoTEST™ アッセイと BCA テストにより、エクソソーム量およびトータルタンパク質量の測定を行います。細胞外小胞は 6 ～ 11 分画に溶出し、血漿は 14 ～ 24 分画に溶出しました（図 1、図 2）。

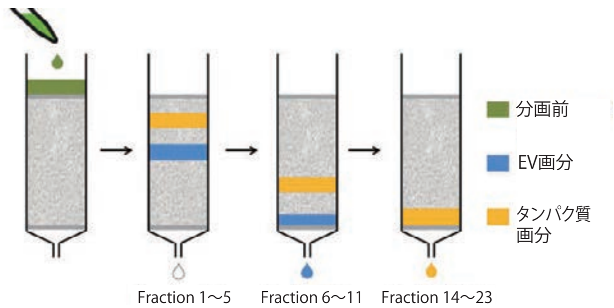


図 1　PURE-EV カラムによるヒト血漿からのエクソソーム分離

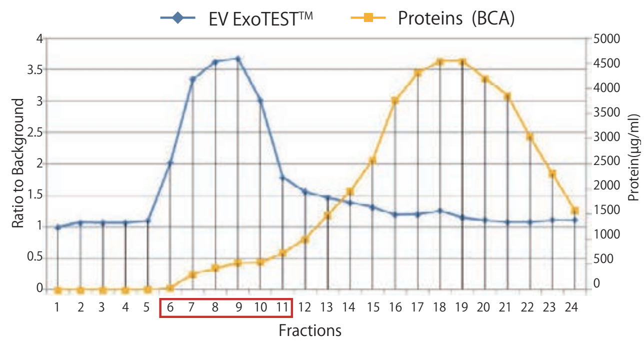


図 2　各分画でのエクソソーム量とトータルタンパク質量のつり合い
ExoTEST™ アッセイによる解析の結果、エクソソームを含む細胞外小胞は 6 ～ 11 分画に溶出しており、血漿タンパク質（14 ～ 24 分画に溶出）からうまく分離されていることが確認された。

ナノ粒子トラッキング解析

次に 24 分画を 4 グループ（1 ～ 6、7 ～ 12、13 ～ 18、19 ～ 24）に分け、ナノ粒子解析装置（NanoSight）を用いてナノ粒子トラッキング解析（Nano Tracking Analysis；NTA）を行いました。その結果、ExoTEST™ アッセイの結果と NTA 解析には整合性が確認され（図 3）、細胞外小胞とタンパク質は完全に分離されていることが示されました（図 4、図 5）。

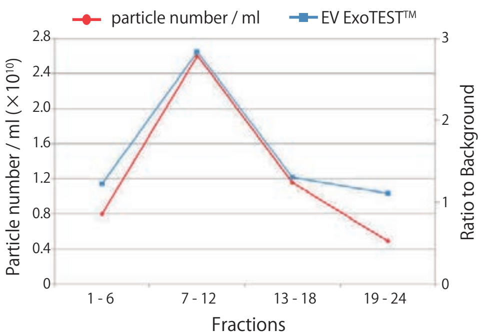


図 3　細胞外小胞の溶出ピークを比較（ExoTEST™ アッセイ vs NTA 解析）

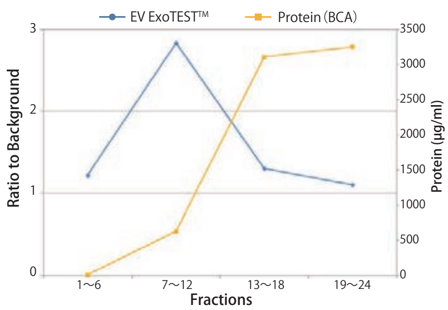


図 4　細胞外小胞とタンパク質の溶出量を比較（ExoTEST™ アッセイ vs NTA 解析）

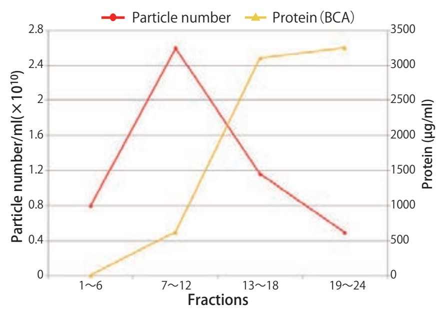


図 5　細胞外小胞とタンパク質の溶出量を比較（NTA 解析 vs BCA テスト）

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/cf-RNA 精製
その他
受託サービス

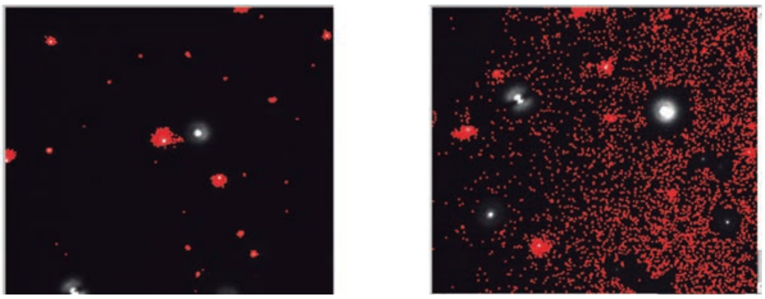


図 6　miniPURE-EV により過剰な色素を除去
CT116 細胞由来の精製 EV 10 µg を、膜色素 Cell Mask Green で標識した。
過剰な色素は mini-PURE-EV を用いて除去され、Zetaview によるナノ粒子トラッキング解析で色素が除去できていることを確認した。
左：mini-PURE-EV によって除去される余分な色素
右：余分な膜色素が除去されていない状態

[HansaBioMed OU　　メーカー略号：HNB]

品名	サンプル容量	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
PURE-EV : Size Exclusion Chromatography Column	500 µL ～ 2 mL	HBM-PEV-5 HBM-PEV-10	5 columns 10 columns	¥85,000 ¥177,000	冷 冷
miniPURE-EV : Size Exclusion Chromatography Column	100 ～ 500 µL	HBM-MPEV-10 HBM-MPEV-20	10 columns 20 columns	¥87,000 ¥167,000	冷 冷
maxiPURE-EVs : Size Exclusion Chromatography Column	5 ～ 20 mL	HBM-MXPEV-3 HBM-MXPEV-6	3 columns 6 columns	¥167,000 ¥327,000	冷 冷

EVs 精製 ▸▸▸ タンジェンシャルフローろ過　　WEB 記事 ID 検索 ▸▸▸ 43610

タンジェンシャルフローろ過 TFF-Easy

Hansa BioMed

15 mL 以下のサンプルの濃縮や前処理として最適

濃縮（pore size : 5 nm, cut off : 20 kDa）

TFF-Easy はポリスルフォンで作られた中空糸のフィルターカートリッジであり、細胞培養上清や尿などの低濃度マトリックスから小さなタンパク質や分子を濃縮および除去できるため、細胞外小胞（EV）精製の前処理に適しています。
カートリッジの寸法が小さいため、5 mL からリットル単位の範囲のサンプルを濃縮することが可能です。また、EV サンプルの脱塩にも適しています。
TFF-Easy は簡単に洗浄でき、複数回利用できます。

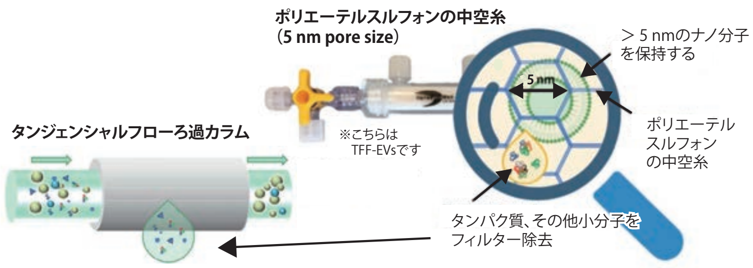


図　タンジェンシャルフローろ過（TFF）は粒子のサイズによる分画します。メンブレン面に対して平行方向にサンプルを還流させサイズ分画するため、メンブレンへの微粒子の堆積が抑制されます。

特長

●洗浄可能
●複数回使用可能（最大 20 回）
●容易な操作方法
●EV サンプルの脱塩・バッファー交換に使用可能
●濃縮時間：5 分程度
●ポアサイズ：5 nm

アプリケーション

●EV 単離前の、細胞培養上清や尿の低濃度マトリックスの濃縮
●EV サンプルからの小分子やイオンの除去
●EV サンプルの脱塩・バッファー交換
●SEC カラム（PURE-EV）（50 ページでご紹介）と組み合わせた TFF-Easy の使用による高効率の EV 分離

■動画あります
コスモ・バイオのWeb に、実際の使用方法の動画へのリンクがございます。
WEB 記事ID 43610 検索

[HansaBioMed OU　　メーカー略号：HNB]

品名	EV recovery	濃縮時間	使用可能回数	サンプル量	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
TFF-Easy - tangential flow filtration EV concentrator	＞83%	5 分	20 回まで	5 ～ 15 mL	HBM-TFF/1 HBM-TFF/5	1 Unit 5 Units	¥73,000 ¥333,000	室 室

タンジェンシャルフローろ過 TFF-EVs

HansaBioMed

10 分以下でサンプルの EV 精製と濃縮を同時に

濃縮と精製（pore size : 50 nm, cut off : 800 kDa）

TFF-EVs は、ポリスルフォンで作られた中空糸のフィルターカートリッジで、希釈された試料（細胞培養上清、尿など）から小さなタンパク質や分子を濃縮および除去できるため、迅速かつ高い再現性で EV を精製するのに適しています。スケールアップも可能です。また、サンプルの精製と濃縮を同時に行うことが可能です。

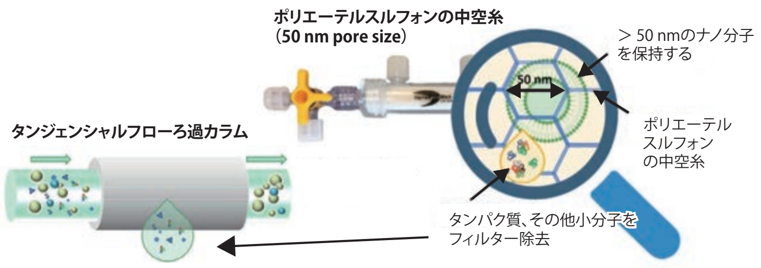


図 1　タンジェンシャルフローろ過（TFF）は粒子のサイズによる分画します。メンブレン面に対して平行方向にサンプルを還流させサイズ分画するため、メンブレンへの微粒子の堆積が抑制されます。

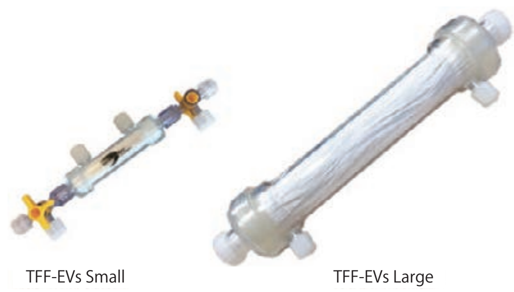


図 2

商品	TFF-EVs Small	TFF-EVs Large
品番	HBM-TFF-EVS-S	HBM-TFF-EVS-L
カートリッジ内の中空糸素材	ポリエーテルスルホン（PES）	
フィルターの表面積（sqm）	0.025	1
ポアサイズ（nm）	50 +/- 10	
分画分子量（kDa）	800 +/- 50	
容量（mL）	10 ～ 1,000	500 ～ 10,000
EV recovery	＞ 81%	＞ 80%
濃縮時間	5 分	78 ～ 115 mL/ 分
使用可能回数	何度も使用可能	何度も使用可能

特長

- ●ポアサイズ：50 nm
- ●幅広いサイズの EV 精製・濃縮が可能
- ●洗浄可能
- ●複数回使用可能

アプリケーション

- ●迅速かつスケールアップ可能な EV の精製と濃縮
- ●FBS からウシ由来 EV を除去
- ●バッファー交換と未結合色素の除去

使用方法と商品データ

Step1　サンプルを注入、シリンジを上下させ、液を濾過して試験管に出す。

Step2　洗浄バッファーを加えて、またシリンジを上下させ、洗浄バッファーを排出させる。

Step3　細胞外小胞や、同じサイズの粒子を回収する。

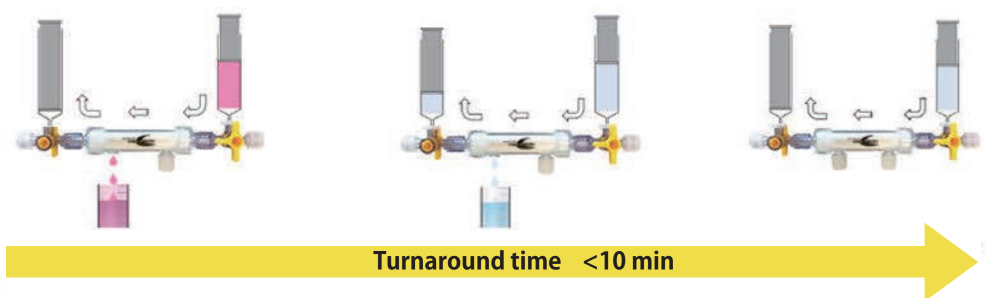


図 3

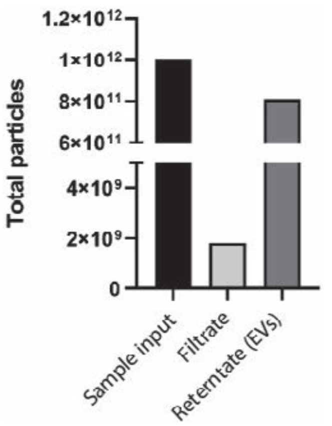


図 4　粒子の損失を最小限に抑えた高速精製
1 × 10^{12} の精製 EVs（品番：HBM-PEU-100 ※）を 1 × PBS 20 mL で希釈し TFF-EVs にセットした。EVs を含むろ液を 1 × PBS 5 mL で回収した。ろ液および回収液の粒子含有量を NTA（Zetaview, Particle Metrix）で分析した。
※品番：HBM-PEU-100/2 と HBM-PEU-100/5 について
品名：Lyophilized Exosomes from Urine of Healthy Donors、包装：200 µg または 500 µg、希望販売価格：¥98,000 または ¥199,000

■動画あります

実際の使用方法の短時間の動画をご覧になれます。

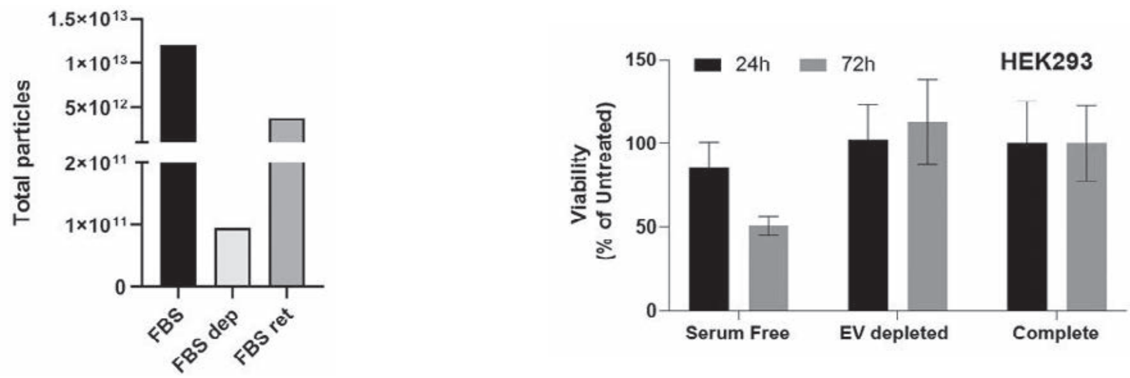


図 5　FBS 含有ウシ EV の除去
FBS 含有ウシ EV を除去するために TFF-EVs を使用した。FBS 50 mL を TFF-EVs でろ過し、EV が除去された FBS（ろ液）、ウシ由来 EV が含まれている 1 × PBS バッファー 10 mL（保持液）に分離した。通常の FBS、ろ液、保持液をすべて NTA（Zetaview、Particle Metrix）で分析したところ、ろ液には通常の FBS で検出された全粒子の 1% しか含まれていないことがわかった。

［HansaBioMed OU　　メーカー略号：HNB］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
TFF-EVs-Small- tangential flow filtration-based device	HBM-TFF-EVS-S	1 Unit	¥96,000	室
TFF-EVs-Large- tangential flow filtration-based device	HBM-TFF-EVS-L	1 Unit	¥163,000	室

■ 関連商品　TFF-MV

追加の精製を行わずに、大きな微小胞をワンステップで回収

ポアサイズが 200 nm のフィルターカートリッジです。10,000 *g* の遠心分離では小さな EV の一部を損失しますが、TFF-MV では 150（～ 200）nm 以上の微小胞をカラムの中にキャッチし、小さな EV や分子を容易にフィルターを透過させます。5 mL から最大 1 L の尿や細胞培養液、植物抽出液などでご使用いただけます。

［HansaBioMed OU　　メーカー略号：HNB］

品名	EV recovery	濃縮時間	使用可能回数	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
TFF-MV- tangential flow filter for large EV separation and recovery	83%	5 分	20 回まで	HBM-TFF-MV	1 Unit	¥73,000	室

EVs 精製 ▸▸▸ EV 用イオン交換法　　記事 ID 検索 ▸▸▸ 43987

EV-Capture™ EV Purification Spin Column Kit

コスモ・バイオ株式会社

少量・多検体の Extracellular vesicle（EV）精製に最適

トライアルサイズあります

少量・多検体の EV 精製に最適、安価で容易！

細胞外小胞（extracellular vesicle ： EV）表面が負に帯電していることを利用して精製するキットです。生体試料や培養上清から EV を精製する際には超遠心法が最もよく使われていますが、高額な設備と長時間の処理が必要となります。本キットは、小型卓上遠心機でご使用可能なスピンカラムタイプで、安価で容易にインタクトな EV を回収できます。そのため、**少量・多検体の EV 精製に最適**です。

EV-Capture™

特長

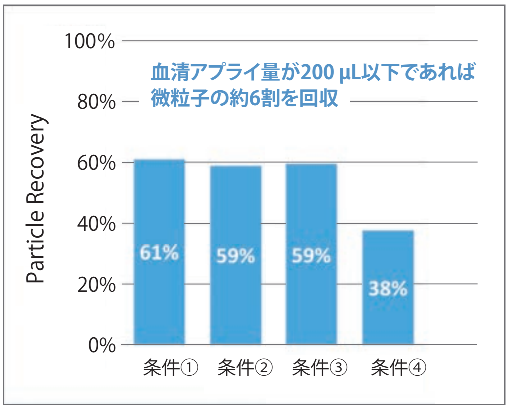
- ●簡単な操作で 30 分以内にインタクトな EV（エクソソームを含む）を回収可能
- ●生体サンプルや培養上清など、幅広いサンプルに使用可能
- ●ヒト・マウス等生物種問わず、乳酸菌等の微生物の EV も回収可能
- ●血清サンプルでは約 98% のタンパク質を除去可能
- ●**小型卓上遠心機で使用可能なスピンカラムタイプ**

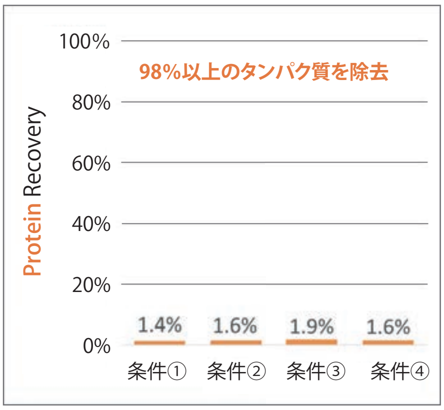
精製例①　血清サンプルでは約 98% のタンパク質を除去可能

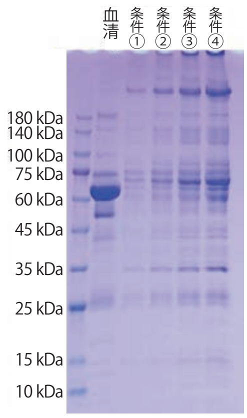
血清アプライ量を 50 μL から 400 μL まで増加させ、ヒト血清を EV-Capture™ EV Purification Spin Column で精製しました。血清は 12,000 × *g* で 15 分間遠心分離し、上清を 0.45 μm のフィルターで処理しました。血清アプライ量を条件① 50 μL、条件② 100 μL、条件③ 200 μL、条件④ 400 μL にて精製し、ナノサイトで精製物の微粒子濃度を測定しました。タンパク濃度は Bradford 法で測定し、SDS-PAGE で精製前後のバンドパターンを比較しました。

血清アプライ量が 200 μL 以下であれば微粒子の約 6 割を回収することができ、98% 以上のタンパク質を除去することができました。SDS-PAGE のバンドパターンも精製前と大きく変化しており、主要タンパク質を効率的に除去できていることが分かります。

	精製した血清量（μL）	精製時希釈倍率	溶出容量（μL）	微粒子濃度（particles/mL）	タンパク濃度（mg/mL）	泳動アプライ量（μL）	泳動アプライ量血清相当量（μL）
血清	—	—	—	4.14×10^{12}	55.54	0.1	0.1
条件 1	50	6	300	4.22×10^{11}	0.13	5	0.83
条件 2	100	4	300	8.14×10^{11}	0.29	5	1.67
条件 3	200	2	300	1.64×10^{12}	0.69	5	3.33
条件 4	400	2	300	2.08×10^{12}	1.16	5	6.67





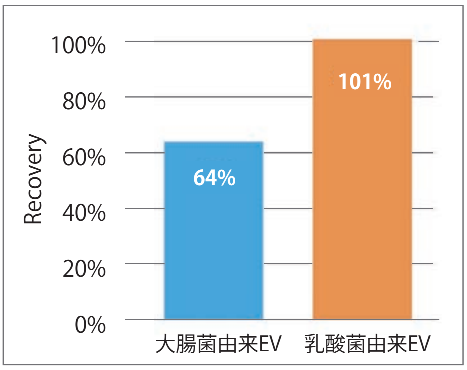


精製例②　微生物由来 EV の回収

1. 大腸菌由来EV(品番：ECEV※)と2. 乳酸菌由来EV(品番：LBEV-R2※)をそれぞれ 5.0 × 10⁹ particles/mL に調製して EV-Capture™ EV Purification Spin Column に 0.6 mL アプライして回収しました。標品と回収物をグラム陰性菌由来 EV 検出キットおよびグラム陽性菌由来 EV 検出キット（近日発売予定）で比較して回収率を算出しました。

大腸菌由来 EV は 64%、乳酸菌由来 EV は 101% 回収することができました。

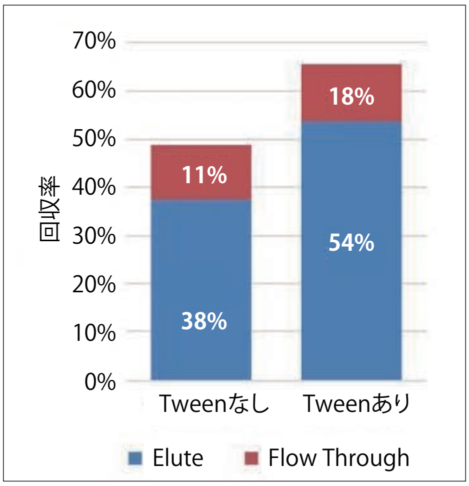
※大腸菌由来 EV（品番 ： ECEV）と乳酸菌由来 EV（品番 ： LBEV-R2）は 33 ページからご紹介しています。



精製例③　Tween20 添加による回収率向上

約 1.0 × 10^{10} particles/mL の培養上清を EV-Capture™ EV Purification Spin Column に 0.7 mL アプライして回収しました。精製前の培養上清と精製物をヒト由来エクソソーム定量用 CD9 × CD63 ELISA キット（品番 ： EXH0102EL※）で比較して回収率を算出しました。溶出バッファーに 0.01% の Tween20 を添加することで、回収率が 1.4 倍に増加しました。

※ヒト由来エクソソーム定量用 CD9 × CD63 ELISA キット（品番 ： EXH0102EL）は 74 ページでご紹介します。



［コスモ・バイオ株式会社　　メーカー略号：CSR］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
EV-Capture™ EV Purification Spin Column Kit	EVP01-010	1 kit（10 prep.）	¥20,000	室

■留意点

サンプルの pH が 9 を超えると回収率が低下する可能性があります。中和するか付属バッファーで希釈してご使用ください。

血清などのタンパク質濃度が高いサンプルは 2 ～ 6 倍に希釈してからアプライしてください。

サンプルアプライ量は 300 ～ 700 µL になるよう調整してください。

精製物に樹脂片が混入することがあります。ナノ粒子トラッキング解析などに使用する場合には精製物の遠心上清をご使用ください。

精製物には高濃度の塩が含まれています。必要に応じて透析や限外ろ過などで溶媒置換を行ってください。

トライアルサイズあります

無料サンプルをご用意しております！
コスモ・バイオ（欄外参照）までお問い合わせください。

＊ 無料サンプルは 1 研究室あたり 1 点のみ
無料サンプル（品番：EVP01-004S　4 本入り）

PureExo® エクソソーム単離キット

101 Bio

細胞培養上または血清／血漿サンプルから高純度・高収率・迅速に回収

トライアルサイズあります

PureExo® エクソソーム単離キットは、細胞培養上清（品番：P100）血清／血漿（品番：P101）または幹細胞培養上清（品番：P107）から完全なエクソソームを、迅速かつ効果的に回収することができます。

特長

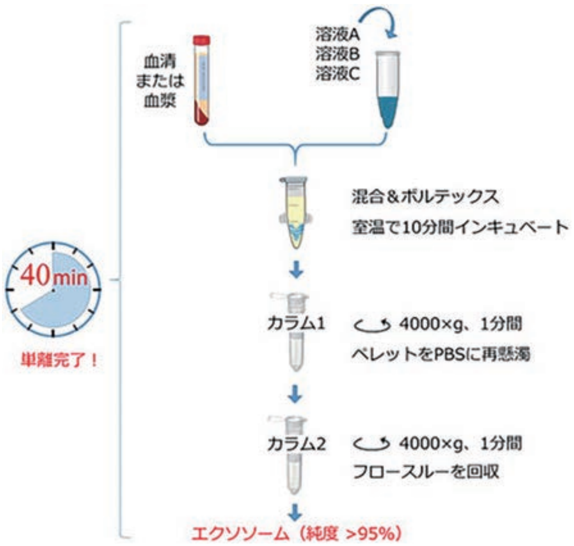
- ●超遠心、煩雑な単離操作は不要
- ●操作時間：細胞培養上清用 **約 2 時間**、血清／血漿用 **約 40 分**
- ●超遠心分離法よりも高い回収率（約 10 倍）
- ●抗体ベースの手法より低コスト
- ●高純度のエクソソームを回収可能（純度＞ 95%）
- ●少量のサンプル（細胞培養上清：2 ～ 4 mL、血清／血漿：100 ～ 400 µL）から高収率で回収
- ●回収したエクソソームは各種アプリケーションに適用可能（EM 研究、エクソソームラベル、エクソソームサブポピュレーション、エクソソーム miRNA の qRT-PCR プロファイリング、エクソソームタンパク質のゲル分析など）

研究者が使ってみました！
Application Note
あります！

58 ページにユーザーからのレポートである Application Note を掲載しています。

プロトコール

■血清／血漿用キット プロトコール概略



商品データ

■精製したエクソソームの透過型顕微鏡画像

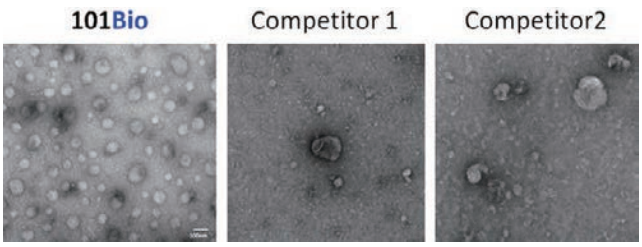


図 1 NIH3T3 細胞培地から 101 Bio 社 品番：P100 および他社品を用いて回収したエクソソームの透過型電子顕微鏡画像
101 Bio 社 品番：P100 を使用して得られたエクソソームは、膜に包まれた球状の粒子（直径 50 ～ 150 nm）として観察された。一方他社品を用いて回収したエクソソームは、粒子の形状およびサイズが不均一であり、ダメージを受けた、あるいは小胞の破片であることが考えられる。

■精製したエクソソームのマーカー分析

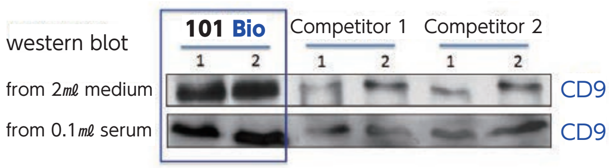


図 3 エクソソーマルタンパク質マーカー分析
NIH3T3 細胞の培地 2 mL および血清 0.1 mL から 101 Bio 社 品番：P100 および他社品を用いて、それぞれエクソソームを単離した。回収したエクソソームを溶解し、得られたエクソソームタンパク質を、4 ～ 20% グラジエントポリアクリルアミドゲルにロードして分離した。エクソソームのマーカー CD9 および脂質ラフトマーカーフロチリンを、それぞれ抗 CD9 抗体で認識させ、イムノブロット分析した。101 Bio 社 品番：P100 は、他社品と比べて、高純度、高収率のエクソソームを単離した。

■精製したエクソソームの粒度分布分析

	Exosome purity (30 ~ 150 nm)
101Bio	96.3%
Competitor 1	37.7%
Competitor 2	26.1%

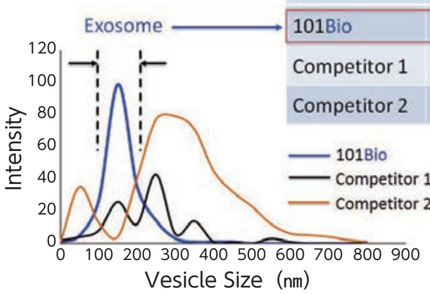


図 2 粒度分布分析
NIH3T3 細胞（1 × 10⁶ 細胞）の培地から、101 Bio 社 品番：P100 および他社品を用いて、トータルエクソソームを単離し、BI 200SM Research Goniometer System（632.8 nm レーザー）を用いて動的光散乱（DLS：dynamic light scattering）を測定した。101 Bio 社 品番：P100 を用いて単離したエクソソーム群の DLS 分布は、単一ピークを示し、96.3% がエクソソームの粒径として考えられる直径 30 ～ 150 nm の範囲であった。一方他社品を用いて回収したエクソソームのうち、30 ～ 150 nm の範囲としてカウントされたものはそれぞれ 37.7%、および 26.1% であった。

■エクソソーム由来 RNA の定量分析

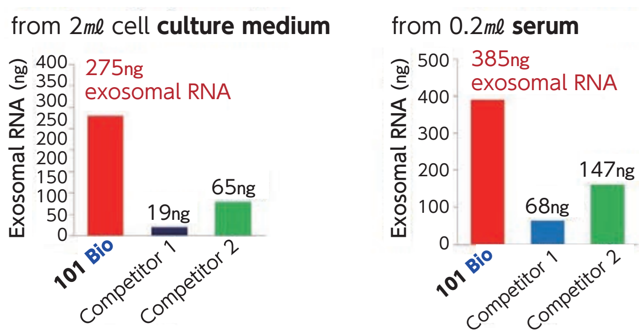


図 4 エクソソーム由来 RNA の定量分析
左）101 Bio 社 品番：P100 および他社品を用いてエクソソームを単離した。トータルエクソソーム RNA を NanoDrop 8000 分光光度計で計測した。101 Bio 社 品番：P100 で単離したエクソソームは、他社品よりも、エクソソーム由来 RNA 量が多かった。
右）101 Bio 社 品番：P101 および他社品を用いてエクソソームを単離した。トータルエクソソーム RNA を NanoDrop 8000 分光光度計で計測した。101 Bio 社 品番：P100 で単離したエクソソームは、他社品よりも、エクソソーム由来 RNA 量が多かった。

PureExo® エクソソーム単離キット

■細胞培養上清用

［101 Bio, LLC　メーカー略号：OBL］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
PureExo® Exosome Isolation kit (for cell culture media), Trial size	P100S	1 kit（2 rxns）	¥33,000	室
PureExo® Exosome Isolation kit (for cell culture media)	P100	1 kit（10 rxns）	¥90,000	室
PureExo® Exosome Isolation kit (for cell culture media), Large	P100L	1 kit（40 rxns）	¥348,000	室

■血清／血漿用

［101 Bio, LLC　メーカー略号：OBL］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
PureExo® Exosome Isolation kit (for serum & plasma), Trial size	P101S	1 kit（2 rxns）	¥33,000	室
PureExo® Exosome Isolation kit (for serum & plasma)	P101	1 kit（10 rxns）	¥90,000	室
PureExo® Exosome Isolation kit (for serum & plasma), Large	P101L	1 kit（40 rxns）	¥348,000	室

■幹細胞培養上清用

［101 Bio, LLC　メーカー略号：OBL］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
PureExo® Exosome Isolation kit (for stem cell culture media)	P107S	1 kit（2 rxns）	¥48,000	室
	P107	1 kit（10 rxns）	¥106,000	室

商品使用文献

［PureExo® エクソソーム単離キット（細胞培養上清用 品番：P100）］

1. Osteikoetxea X, Németh A, Sódar BW, Vukman KV, Buzás EI. **Extracellular vesicles in cardiovascular diseases, are they Jedi or Sith?** *J Physiol*. 2016 Feb 13. doi: 10.1113/JP271336
2. Korbelik M, Banáth J, Zhang W, Wong F, Bielawski J, Separovic D. **Ceramide and Sphingosine-1-Phosphate/Sphingosine act as Photodynamic Therapy-Elicited Damage-Associated Molecular Patterns: Release from Cells and Impact on Tumor-Associated Macrophages.** *J Anal Bioanal* Tech. S1:009. doi: 10.4172/2155-9872.S1-009 (2014)
3. Salama A, Fichou N, Allard M, Dubreil L, De Beaurepaire L, Viel A, Jégou D, Bösch S, Bach JM. **MicroRNA-29b modulates innate and antigen-specific immune responses in mouse models of autoimmunity.** *PLoS One*. 2014 Sep 9;9(9):e106153. doi: 10.1371/journal.pone.0106153. (Sold through our European distributor - Gentaur.)
4. Marędziak M, Marycz K, Lewandowski D, Siudzińska A, śmieszek A. **Static magnetic field enhances synthesis and secretion of membrane-derived microvesicles (MVs) rich in VEGF and BMP-2 in equine adipose-derived stromal cells (EqASCs)-a new approach in veterinary regenerative medicine.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2015 Mar;51(3):230-40. doi: 10.1007/s11626-014-9828-0.
5. Tomoyo Kawakubo-Yasukochi, Masahiko Morioka, Yoshikazu Hayashi, Takuya Nishinakagawa, Mai Hazekawa, Shintaro Kawano, Seiji Nakamura, Manabu Nakashima **The SQUU-B cell line spreads its metastatic properties to nonmetastatic clone SQUU-A from the same patient through exosomes.** *J of Oral Biosciences* 2015/09
   PureExo® citation from Japan distributor Cosmo indicates interesting exosome function: "exosome derived from highly metastatic SQUU-B cells conferred metastatic ability to nonmetastatic SQUU-A cells."
6. William G. Whitford **Exosomes: A Major Phenomenon Flying Under the Radar** *cellculturedish.com* 2015/09
7. Bonafede R, Scambi I, Peroni D, Potrich V, Boschi F, Benati D, Bonetti B, Mariotti R. **Exosome derived from murine adipose-derived stromal cells: Neuroprotective effect on *in vitro* model of amyotrophic lateral sclerosis.** *Exp Cell Res*. 2016 Jan 1;340(1):150-8. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.12.009. Epub 2015 Dec 18.
8. Zhou Y, Fang L, Yu Y, Niu J, Jiang L, Cao H, Sun Q, Zen K, Dai C, Yang J. **Erythropoietin protects the tubular basement membrane by promoting the bone marrow to release extracellular vesicles containing tPA-targeting miR-144.** *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016 Jan 1;310(1):F27-40. doi: 10.1152/ajprenal.00303.2015. Epub 2015 Oct 14.
9. Campbell CR, Berman AE, Weintraub NL, Tang YL. **Electrical stimulation to optimize cardioprotective exosomes from cardiac stem cells.** *Med Hypotheses*. 2016 Mar;88:6-9. doi: 10.1016/j.mehy.2015.12.022. Epub 2016 Jan 11.
10. Zhu D, Liu Z, Wang F. **Effect of exosome extracted from 3T3 on proliferation of mouse colorectal cancer cells CT26.** *Chin J of Exp Surg*. 2015 July;32(7):1634-36
11. Rager T, Olson J, Zhou Y, Wang Y, Besner G. **Exosomes Secreted from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Protect the Intestines from Experimental Necrotizing Enterocolitis.** *J Pediatr Surg.* 2016 March;S0022-3468(16)00149-4
12. Li X, Liu L, Yang J, Yu Y, Chai J, Wang L, Ma L, Yin H. **Exosome Derived From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Mediates MiR-181c Attenuating Burn-induced Excessive Inflammation.** *EBioMedicine.*2016, http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.030
13. Masahiko Morioka, Tomoyo Kawakubo-Yasukochi, Yoshikazu Hayashi, Mai Hazekawa, Takuya Nishinakagawa, Kazuhiko Ono, Shintaro Kawano, Seiji Nakamura, Manabu Nakashima. **Exosomes from oral squamous carcinoma cell lines, SQUU-A and SQUU-B, define the tropism of lymphatic dissemination.** *J of Oral Biosciences.* 2016, http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2016.05.001i

［PureExo® エクソソーム単離キット（血清／血漿用 品番：P101）］

1. Chen L, Chen R, Kemper S, Charrier A, Brigstock DR. **Suppression of fibrogenic signaling in hepatic stellate cells by Twist1-dependent microRNA-214 expression: Role of exosomes in horizontal transfer of Twist1.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2015 Sep 15;309(6):G491-9. doi: 10.1152/ajpgi.00140.2015. Epub 2015 Jul 30. This paper is awarded TOP 10 best original research papers published by the American Physiological Society (APS Select). **Link**
   (APSselect is a collection of the very best original research papers published by the American Physiological Society. Each month, the most outstanding recently published papers from our ten research journals are selected and made available through this multi-journal website.)
2. Osteikoetxea X, Németh A, Sódar BW, Vukman KV, Buzás EI. **Extracellular vesicles in cardiovascular diseases, are they Jedi or Sith?** *J Physiol*. 2016 Feb 13. doi: 10.1113/JP271336
3. William G. Whitford Exosomes: **A Major Phenomenon Flying Under the Radar** *cellculturedish.com* 2015/09
4. Chen L., Chen R., Brigstock D. **MicroRNA profiling of circulating exosomes during experimental liver fibrosis.** *Hepatology*. AASLD abstract, 2014 Oct. (Presidential Honored Distinct Abstract).

FAQ 細胞培養上清および血清中のエクソソームを精製する、PureExo® エクソソーム単離キットについて

Q1 本キットで、培養上清から大きな細胞外小胞（最大直径 1,000 nm）を単離／精製することはできますか？

A1 できません。本キットでは、直径が 300 nm 以上の小胞は単離できません。

Q2 本キットを血漿に使用することはできますか？

A2 血漿と血清の両方にご使用いただけます。

Q3 本キットで処理できる血清サンプルの必要最低量は？

A3 必要最低量は 50 μL です。100 ～ 400 μL の血清／血漿をご使用いただくことを推奨します。

Q4 本キットで、培養細胞から、エクソソームや内皮微粒子を単離できますか？

A4 品番：P100 のキットは、細胞培養上清からエクソソームを単離するために使用するキットです。細胞から微粒子を単離することはできません。

Q5 本キットで精製したエクソソームには、IgG やビーズが混入していますか？

A5 本キットは、単離に抗体やビーズを使用しないため、最終的に単離されたエクソソームに人工的に作製した IgG やビーズが混入することはありません。

Q6 本キットで精製したエクソソームには、アルブミンが含まれていますか？

A6 細胞や血清サンプルの種類によっては、アルブミンが含まれる場合があります。例えば、肝細胞ではアルブミンが産生され、肝臓由来のエクソソーム（アルブミンを含む）が循環系に放出される可能性があります。

Q7 本キットを、アメーバ状のキイロタマホコリカビ（*D.discoideum amoeba*）に使用することはできますか？

A7 本キットは、細胞から放出されたエクソソームや微小胞を捕捉します。アメーバのエクソソームを単離するには、細胞の場合と同様にアメーバの培養上清を回収し、本キットで精製することをお奨めします。

Q8 最終的なエクソソームの調製液に含まれるバッファーはどのような組成ですか？精製したエクソソームを用いたアッセイに影響はありますか？

A8 最終的に単離したエクソソームは、PBS に懸濁された凝集ナノ粒子で、元々の培養上清または血清がごく微量含まれています。RNA ／タンパク質の抽出、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いたアッセイ、表面標識などの各種アッセイに、バッファーの影響を考慮せずにご使用いただくことができます。

Q9 単離したエクソソームが高純度で、膜由来の微粒子（破砕された小胞）を含まないことをどうすれば確認できますか？

A9 透過型電子顕微鏡（TEM）観察より確認できます。本商品で細胞培養上清や血清から単離した微小胞は、電子顕微鏡による観察で、粒子を包む直径 20 ～ 200 nm の球状の膜であることがわかっており、これにより、回収した微小胞がエクソソームであるといえます。破砕された小胞は、直径が最大 1,000 nm で、形が不規則であることが報告されています。また、動的光散乱によるサイズ分布パターン解析でも、単離した微小胞の直径が 100 から 200 nm の間にあることが示されています。

Q10 単離されたエクソソームは機能的な活性をもっていますか？

A10 本商品で単離したエクソソームに含まれる、特異的な microRNA（miRNA）の機能を検討しました。miRNA の標的 mRNA 3'UTR 領域を組み込んだレポーターベクターをトランスフェクションした細胞に、エクソソームを添加し、その後ルシフェラーゼ活性アッセイにより、エクソソーム由来の miRNA が機能的に活性であることを確認しています。

Q11 エクソソームの収量はどのくらいですか？

A11 **●PureExo® キット － 細胞培養上清用（品番：P100）**
2 mL の細胞培養上清から、通常 50 ～ 100 μL のエクソソームを単離できます（1 回の反応で最大 4 mL の培養上清を処理できます）。
回収したエクソソームを全て使用して、エクソソーム由来のタンパク質を抽出すると（Exosomal RNA and Protein Extraction Kit、品番：P200 を使用）、得られるタンパク質の量は 2 mL の培養上清から 150 ～ 200 μg、4 mL の培養上清から 300 ～ 400 μg です。
単離したエクソソームを全て使用して RNA を抽出すると（Exosomal RNA and Protein Extraction Kit、品番：P200 を使用）、得られるエクソソーム由来 RNA の量は 2 mL の培養上清から 50 ～ 100 ng、4 mL の培養上清から 100 ～ 200 ng です。

●PureExo® キット － 血清／血漿用（品番：P101）
100 ～ 400 μL の血清から、通常 100 ～ 200 μL のエクソソーム（PBS に懸濁）を単離できます。
回収したエクソソームを全て使用して、エクソソーム由来のタンパク質を抽出すると（Exosomal RNA and Protein Extraction Kit、品番：P200 を使用）、得られるタンパク質の量は 300 ～ 400 μg です。
単離したエクソソームを全て使用して RNA を抽出すると（Exosomal RNA and Protein Extraction Kit、品番：P200 を使用）、得られるエクソソーム由来 RNA の量は 200 ～ 300 ng です。

品番	品名	サンプル	推奨サンプル量	予想される収量		
				エクソソーム (in PBS)	エクソソーム由来のタンパク質	エクソソーム由来の RNA
P100	PureExo® エクソソーム単離キット 細胞培養上清用	細胞培養上清	2 ～ 4 mL	50 ～ 200 μL	150 ～ 400 μg	50 ～ 200 ng
P101	PureExo® エクソソーム単離キット 血清／血漿用	血清	200 μL	100 ～ 200 μL	300 ～ 400 μg	200 ～ 300 ng

Q12 本キットで血漿からエクソソームを単離する際に、ヘパリン／ EDTA チューブを用いて採血したサンプルを使用することはできますか？

A12 できません。ヘパリンは、エクソソーム精製後の RNA アッセイに有意に影響します。EDTA は、エクソソーム精製後の PCR アッセイに影響を与える場合があります。血液サンプルの採取には、ヘパリン／ EDTA の含まれていないチューブを使用してください。血液サンプルを速やかに遠心し、エクソソームを単離するための血漿を回収します。抗凝固剤を使用する必要がある場合は、EDTA チューブを使用して血液を採取してください。必要に応じて、エクソソーム精製後の PCR 反応の Mg^{2+} 濃度を調整します。

研究者が使ってみました！

Application Note あぷりけーしょんのーと

PureExo Exosome Isolation Kit を用いたエクソソーム回収

ユーザーレポート
安河内（川久保）友世
Tomoyo Kawakubo-Yasukochi
福岡大学 薬学部 統合臨床医学講座 免疫・分子治療学分野

Products

● PureExo® Exosome Isolation Kit（品番：P100）
101 Bio, LLC　メーカー略号：OBL

エクソソームは、タンパク質や様々な核酸物質（mRNA、microRNA（miRNA）など）を内包している細胞間情報伝達小胞と言える。特に、内包されている miRNA は複数の遺伝子をターゲットとしてその発現レベルを調節することから、癌などの複数の遺伝子や蛋白質の発現制御機構の破綻が生じている病態を理解する上で、無視できない研究ターゲットである。

我々は、最近、同一患者由来の転移能の異なるヒト口腔扁平上皮癌細胞株 2 種を用いた実験から、浸潤・転移能を規定する成分が高転移細胞株の培養上清中に存在すること、また、その転移能がエクソソームを介して非転移株に移行することを報告してきた（文献 1,2）。このことは、同一癌巣内のそれぞれの癌細胞が各々の個性を持つエクソソームを分泌しており、それらを介した複雑な細胞間クロストークによって癌微小環境が規定されていることを示唆する知見であり、非常に興味深い。

さて、上記の実験を進めていく過程で、「エクソソームの回収はどうするか？」ということになった訳であるが、まずは、標準的な超遠心法でのスタートを切った。しかし、今後、同一の実験条件で多数のヒト検体を継続的に使用することを考慮に入れた場合、超遠心では時間がいくらあっても足りない。

そこで、各社から販売されているエクソソーム回収キットを検討することとなり、特に純度、操作性、効率性、再現性の面で最も好感を持った 101Bio 社 PureExo Exosome Isolation Kit（品番 : P100）で実験を行うことにした（経済的な面でも、今後もっと好感を持てれば嬉しい）。

本製品を用いて回収したサンプルでは、エクソソームマーカータンパク質であるテトラスパニン（CD9、CD81）の発現が確認でき、エクソソームの存在が確認された（図 1）。また、データシートに記載がある通り、回収した検体における粒度分布が（エクソソームの粒径とされる）30 ～ 150 nm の範囲にピークを持ち、より純度の高いエクソソームが得られていることが分かった。さらに、エクソソームの回収にあたり超遠心機が不要なため、検体数が多い場合にも躊躇なく実験を開始できるようになった。なお、試行錯誤した結果、ある程度（10 ～ 20 倍）濃縮した培養上清を使用することで格段に操作性が上がることが分かったため、以後、当該 Kit 使用時は、濃縮培養上清を用いることにしている。

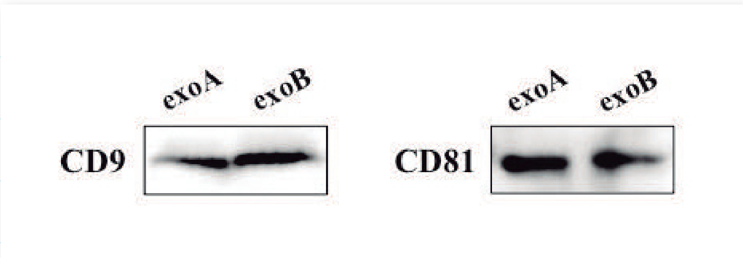


図 1. PureExo Exosome Isolation Kit にて回収したエクソソームにおける CD9 および CD81 の発現レベル（イムノブロット）（文献 1 より）
ExoA：細胞 A 由来エクソソーム、ExoB：細胞 B 由来エクソソーム

敬称は省略させていただきます

その後の解析から、エクソソーム中の浸潤・転移規定因子がmiRNAである見込みが立ったため、PureExo Exosome Isolation Kitで回収したエクソソームからtotal RNAを抽出後、miRNAアレイ解析を行った（投稿準備中）。その際、ボックスプロット、およびスキャタープロット（図2）において偏りのない点の分布が得られたことも、検体のクオリティの高さを証明していた。

上述のように、様々な用途（RNA解析、タンパク質解析、形態解析）において、PureExo Exosome Isolation Kitは、安定したクオリティのエクソソームを提供可能である。特に、培養条件下でのインタクトなエクソソームの機能解析には、非常に有用であるため、是非お勧めしたい。

参考文献

1. Kawakubo-Yasukochi *et al., J Oral Biosci* 58:33-38, 2016
2. Morioka *et al., J Oral Biosci in press.*

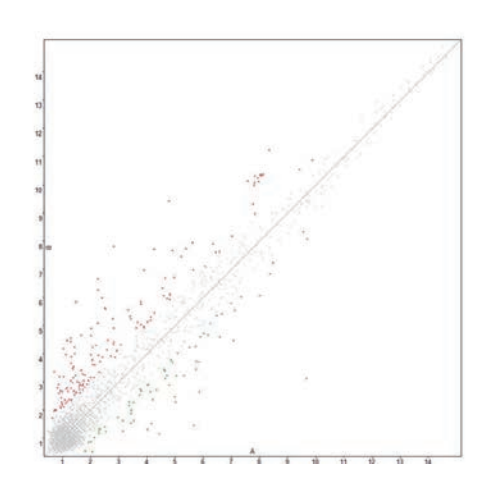


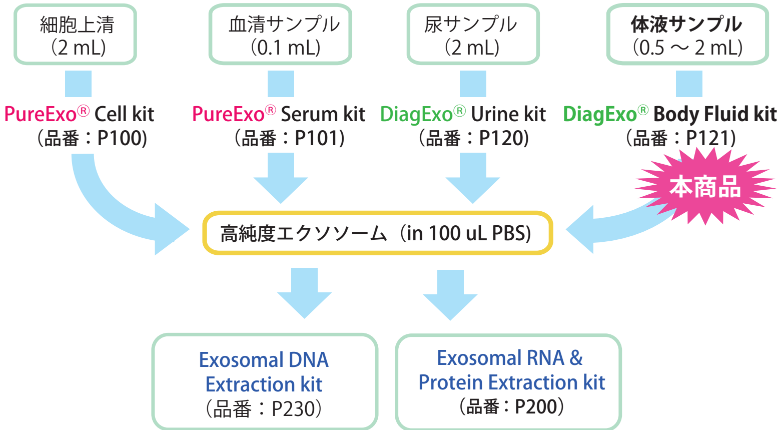
図2. PureExo Exosome Isolation Kitにて回収したエクソソームmiRNAのスキャタープロット
（縦軸、横軸ともに対数目盛）
横軸：ExoA、縦軸：ExoB

DiagExo® ヒト体液エクソソーム単離キット

101 Bio

各種体液サンプルから高収率でエクソソームを回収

本商品は、各種体液サンプル（脳脊髄液（CSF）、羊水、炎症性液、リンパ液、母乳、唾液、胃腸液（GI）、肺胞洗浄液など）からエクソソームを単離するためのキットです。0.5 ～ 2 mL のサンプルから高収率でエクソソームを単離します。単離したエクソソームは、各種アプリケーション（EM 研究、エクソソームラベル、エクソソームサブポピュレーション、エクソソーム由来 miRNA の qRT-PCR プロファイリング、エクソソーム由来タンパク質のゲル分析や ELISA など）に適用できます。



構成内容

- ●溶液 A、B、C
- ●サンプルバッファー
- ●PureExo® カラム

操作概要

❶ 0.5 ～ 1 mL の体液サンプルを用意し、氷上に置く。凍結サンプルの場合は室温で完全に溶解してから、氷上に置く。

❷ 体液サンプルを 3,000 × *g* 、4℃で 15 分遠心し、細胞やデブリを取り除く。

❸ ペレットに触れないよう、0.5 ～ 1 mL の透明な上清を 15 mL チューブに移す。上清にサンプルバッファーを加え、2 mL する。これを希釈体液サンプルとし、氷上に置く。

❹ 1.5 mL チューブを用意し、溶液 A / B / C を A（0.3 mL）、B（0.3 mL）、C（0.3 mL）の順に加え、A / B / C 混合液 0.9 mL を調製する。

❺ A / B / C 混合液を 10 秒間ボルテックスする。

❻ A / B / C 混合液 0.9 mL を③の希釈体液サンプルに加える。

❼ ❻のキャップを閉め、少なくとも 10 回軽く転倒混和させ、4℃で 30 分間インキュベートする。

❽ 混合液は 3 層に分かれる。もし層が見えない場合、5,000 rpm、3 分で遠心をする。中間層に触れないよう、ピペットで上層を吸引し、除去する。

❾ 中間層（エクソソームはこの層にある）を別の 1.5 mL チューブに移す。チューブを 5,000 *g* で 3 分遠心すると、新たに 3 層現れる。

❿ 上層をピペットで取り除く。さらにピペットのチップをチューブの底まで差し込み、下層も取り除き、中間層だけ残す。この層にエクソソームが含まれる。

⓫ もう一度 5,000 *g* で 3 分遠心すると、再び 3 層になる。ステップ 10 を繰り返し、中間層だけ残す。

⓬ チューブのキャップを開けたまま、室温で 5 ～ 10 分乾燥させる。

⓭ 中間層の 4 倍量の PBS を加える。40 回ピペッティングをし、懸濁させる。

⓮ 水平シェーカー上でチューブを高速で 3 分振とうさせ、その後 10 回ピペッティングをする。振とう･ピペッティングをさらに 2 回繰り返す。

⓯ チューブを 5,000 *g*、5 分で遠心し、中間層に触れないよう、上清を PureExo® カラムに移す。

⓰ カラムを 1,000 *g*、5 分で遠心し、ろ過画分を回収する。

⓱ このろ過画分が単離されたエクソソーム。単離したエクソソームはそのまま使用するか、4℃で最大 1 週間、又は−80℃で最大 3 ヵ月間保存できる。

［101 Bio, LLC　メーカー略号：OBL］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
DiagExo® Human Body Fluid Exosome Isolation kit	P121	1 kit（20 rxns）	¥103,000	室

DiagExo® 尿中エクソソーム単離キット

101 Bio

尿サンプルから高収率で回収・分離

トライアルサイズあります

尿サンプルからエクソソームを迅速かつ効率的に単離するキットです。

精製したエクソソームのアプリケーション例

EM 研究、エクソソームラベル、エクソソームサブポピュレーション、エクソソーム miRNA の qRT-PCR プロファイリング、エクソソームタンパク質のゲル分析や ELISA など

特長

- ●高純度のエクソソームを単離
- ●超遠心分離法よりも高い回収率（約 10 倍）
- ●超遠心、煩雑な単離操作は不要、操作時間は 2 時間程度
- ●抗体ベースの手法より低コスト
- ●わずか 1 mL の尿サンプルから高収率でエクソソームを回収

操作概要

❶ サンプルの準備：2 mL の尿サンプルを 3,000 × *g* 4℃で 15 分間遠心し、細胞やデブリを取り除く。
※この工程を省くと、ステップ 15 でフィルターが目詰まりする原因となる。

❷ ペレットを崩さないように注意しながら、2 mL の上清（透明）をガラス管 1 に移し氷上で冷やす。

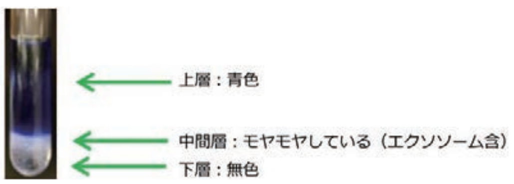
❸ 別のガラス管 2 に溶液 A / B / C を A（0.166 mL）、B（0.166 mL）、C（0.668 mL）の順に加え、A / B / C 混合液を調製する。

❹ ガラス管 2（A / B /C 混合液）を 10 秒ほどボルテックスし、よく混ぜる。

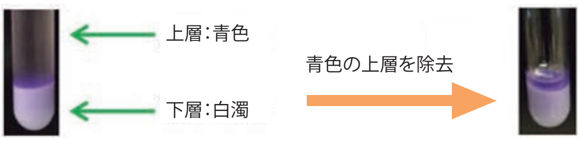
❺ A / B / C 混合液をすべてガラス管 1（尿サンプル 2 mL）に加える。

❻ ガラス管 1 にしっかりキャップをし、少なくとも 10 回、軽く転倒混和させる。その後 4℃で 1 時間インキュベートする。

❼ a. 混合溶液は 3 層に分かれる。中間層を乱さないように注意しながら青色の上層をピペットで取り除き、ステップ 8 に進む。



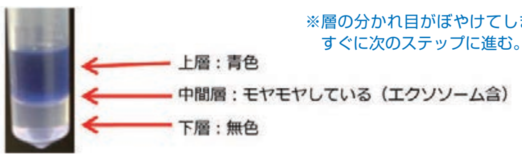
b. 場合により 2 層（上層：青色、下層：白濁）しか見えないことがある。その際には青色の上層を慎重に取り除き、ステップ 8 に進む。



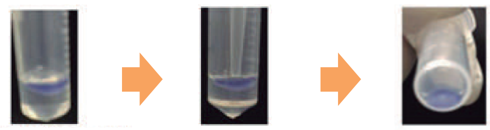
※層の分かれ目がはっきりしない場合は、さらに A / B / C 混合液 1 mL を加え 30 秒ほどボルテックスし、よく混ぜる。4℃で 30 分間インキュベートした後、ステップ 7a から再開する。

❽ ガラス管 1 に残った液体を 2.0 mL 遠心用マイクロチューブに移す。5,000 × *g* で 3 分間遠心すると、さらに 3 層に分かれる。

※層の分かれ目がぼやけてしまうため、すぐに次のステップに進む。



❾ 上層を取り除く。次にピペットのチップをチューブの底まで差し込み、無色の下層を完全に取り除く。チューブにはエクソソームが含まれる中間層のみを残す。



上層（青色）を除去　下層（無色）を除去　中間層（モヤモヤ）のみ残す

❿ 中間層を別の 0.5 mL 遠心用マイクロチューブに移す。5,000 × *g* で 3 分間遠心し、ステップ 9 を繰り返す。モヤモヤしたペレットがチューブに残る。検証実験では、ペレットの容量は約 25 µL。

⓫ 室温で 5 ～ 10 分間、チューブのキャップを開けて乾燥させる。
※乾燥させ過ぎに注意。

⓬ 1 × PBS をペレットの 4 倍量加える。十分にピペッティング（40 回程度）を行い、ペレットを再懸濁する。検証実験では PBS 100 µL（4 × 25 µL ペレット）を加えた。

⓭ チューブを水平型のシェーカーで高速で 3 分間振とうし、十分にピペッティング（10 回程度）する。振とう・ピペッティングをさらに 2 回繰り返す。
※ペレットがうまく再懸濁されないと、エクソソームがペレット中に絡まってしまい、エクソソームの純度および収量が低下する原因になる。ペレットが溶解しにくいサンプルの場合は、ステップ 12 と 13 のピペッティング回数を増やし、振とう時間を延長する。

⓮ チューブを 5,000 × *g* で 5 分間遠心する。ペレットを崩さないように慎重に上清を PureExo® カラム（キット構成品）に移す。

⓯ PureExo® カラムを 1,000 × *g* で 5 分間遠心し、ろ過画分を回収する。

⓰ ろ過画分が分離精製されたエクソソーム。ダウンストリームのアッセイに使用するか冷蔵または冷凍保存する（4℃：1 週間　−80℃：3 ヵ月）。濃縮したエクソソームは静置しておくと沈殿してしまうので、ピペッティングでよく懸濁してから使用する。

［101 Bio, LLC　メーカー略号：OBL］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
DiagExo® Urinary Exosome Isolation kit, Trial size	P120S	1 kit（2 rxns）	¥36,000	室
DiagExo® Urinary Exosome Isolation kit	P120	1 kit（10 rxns）	¥100,000	室
	P120L	1 kit（40 rxns）	¥375,000	室

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/cf-RNA 精製
その他
受託サービス

血清／血漿／尿用 エクソソーム精製キット

NORGEN BIOTEK CORP.

インタクトなエクソソームを精製・濃縮、様々な量のサンプルにも対応

　純度が高く、インタクトなエクソソームを迅速に精製・濃縮できるキットです。また、細胞外小胞の精製にも使用可能で、精製した EVs は任意のアプリケーションにご使用いただけます。

　本商品は、Norgen 社独自の樹脂を用いており、従来法と比較して特別な装置や超遠心分離、沈殿試薬、プロテアーゼ処理を必要としません。また、エクソソーム中の RNA 発現解析時に問題となる RNA 結合タンパク質のコンタミネーションはありません。

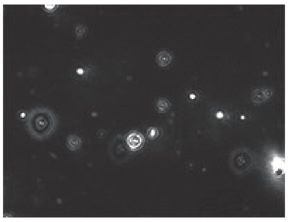


図 1　本商品で濃縮後のエクソソームのサイズおよび濃度を NanoSight® で解析した

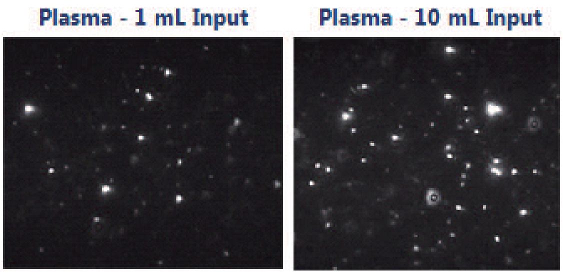


図 2　インタクトなエクソソームを 1 mL と 10 mL の血漿から精製した

Mini キット（品番：57400）または Maxi キット（品番：57600）で精製後、NanoSight® LM10 を使用して可視化および解析を実施した結果、それぞれ 4.04 × 10¹⁰（particles/mL）および 2.95 × 10¹¹（particles/mL）の収量を得た。

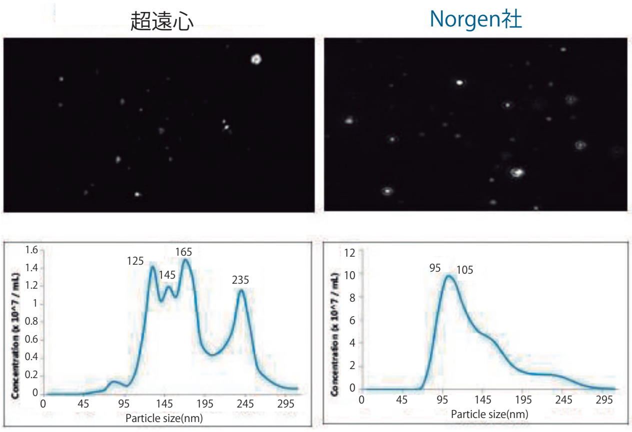


図 3　Norgen 社キットまたは超遠心法を用いてエクソソームを 10 mL の尿サンプルから精製した

超遠心法または Midi キット（品番：57800）で精製後、NanoSight® LM10 を使用して可視化および解析を実施した。その結果、超遠心法では粒径 125 ～ 235 nm ／収量 1.56 × 10⁸（particles/mL）、Norgen 社キットでは粒径 65 ～ 195 nm ／収量 7.63 × 10⁸（particles/mL）の粒子を得た。

特長

- **機能解析のためのインタクトなエクソソームを精製・濃縮**
- 様々な量の血漿・血清サンプルに対応（3 タイプあり）
- 時間を要する超遠心分離、ろ過、特別なシリンジは不要
- オーバーナイトインキュベーション不要
- プロテアーゼ処理不要
- あらゆる動物種に対応
- RNA 結合タンパク質を含まない、高純度なエクソソームを精製
- 精製されたエクソソームは、NanoSight ® または電子顕微鏡を用いて粒子サイズおよび濃度の分析が可能
- 沈殿試薬のコンタミネーションなし
- 10 サンプルの精製に 15 ～ 30 分

構成内容

- Slurry E
- ExoC バッファー
- ExoR バッファー
- Mini フィルタースピンカラム
- 溶出チューブ（1.7 mL）

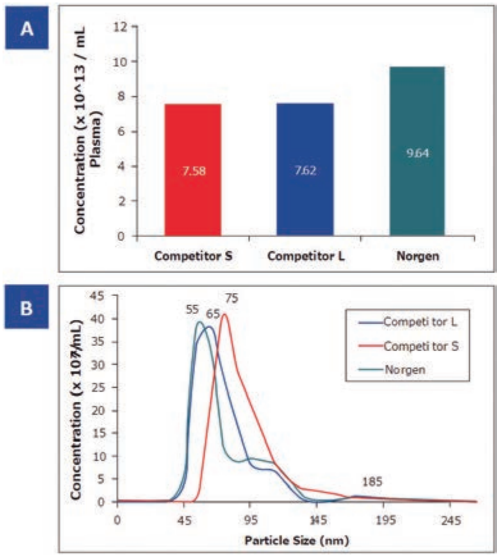


図 4　異なる精製方法を用いてエクソソームを 1 mL の血漿から精製した

Mini キット（品番：57400）、S 社商品および L 社商品を使用してエクソソームを単離後、NanoSight® LM10 で粒径と濃度を解析した。その結果、他社商品よりも高い収量（9.64 × 10¹³ particles/mL）で、高純度なエクソソーム（粒径：50 ～ 150 nm）を得ることができた。

[Norgen Biotek Corp.　　メーカー略号：NOG]

品名	精製エクソソーム粒径	対応サンプル量	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Plasma/Serum Exosome Purification Mini Kit	40 ～ 150 nm	50 µL ～ 1 mL	57400	50 preps	¥170,000	室
Plasma/Serum Exosome Purification Midi Kit	40 ～ 150 nm	1 ～ 4 mL	57500	25 preps	¥159,000	室
Plasma/Serum Exosome Purification Maxi Kit	40 ～ 150 nm	4 ～ 10 mL	57600	15 preps	¥129,000	室
Urine Exosome Purification Mini Kit	40 ～ 150 nm	250 µL ～ 1 mL	57700	50 preps	¥181,000	室
Urine Exosome Purification Midi Kit	40 ～ 150 nm	2 ～ 10 mL	57800	25 preps	¥169,000	室
Urine Exosome Purification Maxi Kit	40 ～ 150 nm	11 ～ 30 mL	57900	15 preps	¥138,000	室

WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 44775

EV-Spinner　限外ろ過濃縮装置

Hansa BioMed

遠心力の反対方向に限外ろ過するので EV の回収に便利

EV-Spinner は、濃縮またはバッファー交換中の細胞外小胞（EV）の回収率を高めるための限外ろ過（UF）濃縮デバイスで、EV が表面につきにくい仕様になっています。限外ろ過は遠心力の反対方向に進むため、粒子は高い回収率で得られます。またタンパク質の結合が少ない膜（PES、ポリエーテルスルホン）を使用することで、V 字型のフィルターと比較して EV の損失が軽減されます。遠心力の反対方向に限外ろ過するので、フィルターは目詰まりしにくくなっています。

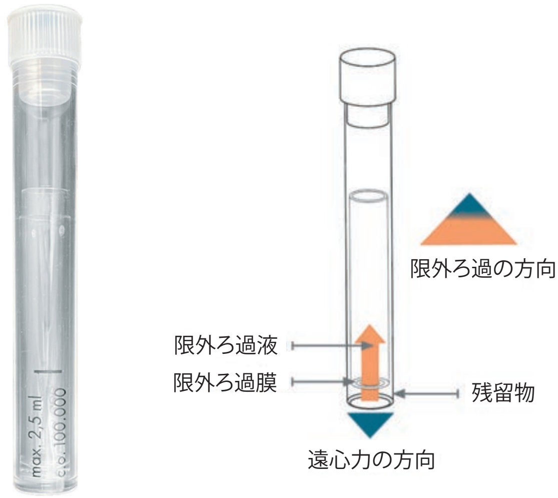


図 1　仕組み

特長

●EV がデバイス表面につきにくく、除去した低分子も容易に回収できる
●デバイスは洗浄可能で何度も使用可能

詳細

●限外ろ過膜の素材：ポリエーテルスルホンのフィルター膜
●分画分子量（MWCO）：100 kDa
●濃縮量：2.5 ～ 0.050 mL
●EV は遠心力の反対方向に集められる

アプリケーション

●EV、エクソソーム、またはナノ粒子を含む溶液の濃縮
●EV 精製前の細胞培地または尿の濃縮
●EV やエクソソーム、ナノ粒子を含む溶液からの低分子や未結合色素の除去
●EV とエクソソームの透析
●サイズ排除クロマトグラフィーで分離後の EV の濃縮

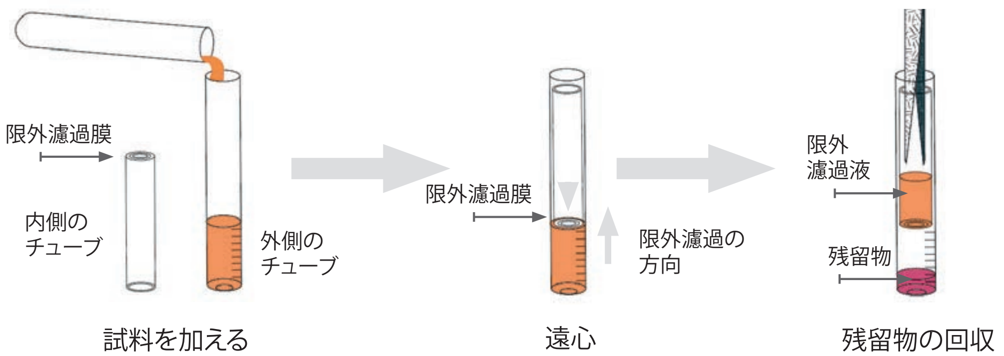


図 2　使用方法

［HansaBioMed OU　　メーカー略号：HNB］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
EV-Spinner 100 kDa MWCO concentrators	HBM-EVS-24 HBM-EVS-48	24 pcs 48 pcs	￥102,000 ￥197,000	室 室

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/cf-RNA 精製
その他
受託サービス

エクソソームのマーカータンパク質

細胞外小胞は大きく 3 種類、①エクソソーム、②マイクロベシクル、③アポトーシス小体に分けられます。それぞれサイズが異なるとともに、発生の起源が異なります。エクソソームの起源は、細胞へのエンドサイトーシスにより作られる初期エンドソームです。一方、マイクロベシクルは、細胞膜が膨らみ、切り離されて分泌されます。起源が異なるため、同じ細胞外小胞でもエクソソームとマイクロベシクルでは異なるタンパク質マーカーがあります。特に、エクソソーム生成時に活躍するタンパク質は、エクソソーム特有のマーカーとして利用されています。

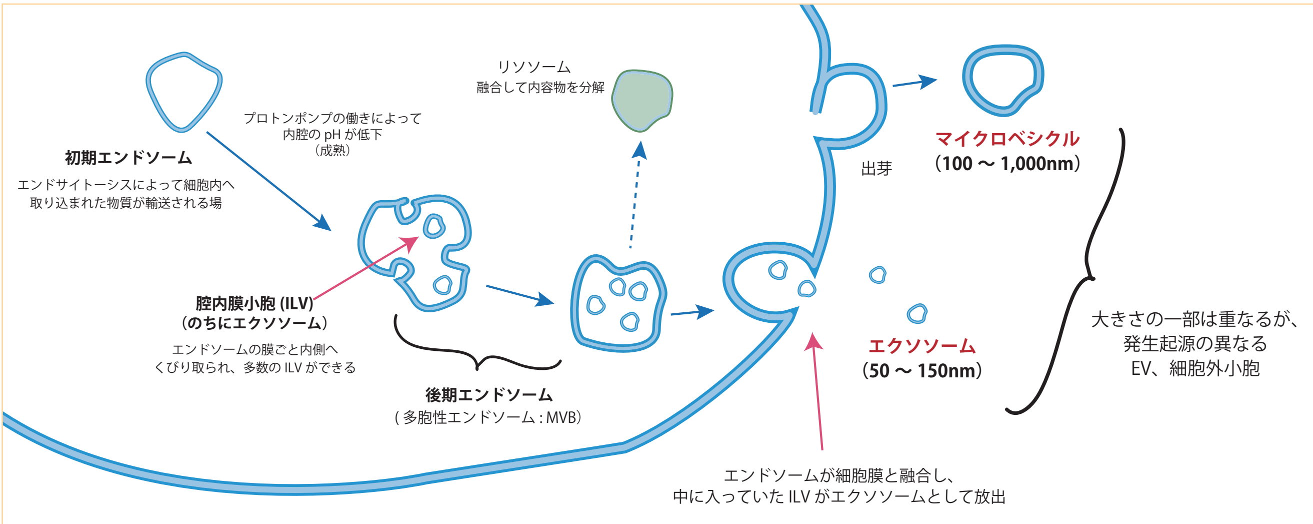


表　起源と直径による細胞外小胞の分類

	エクソソーム	マイクロベシクル	アポトーシス小体
直径	50 ～ 150 nm （または 30 ～ 150 nm）	100 ～ 1,000 nm	100 ～ 5,000 nm
起源	腔内膜小胞として、エンドソームの膜が陥没してエンドソーム内で作られる。分泌によりエクソソームとなる。	細胞膜から直接出芽し分泌される。	死細胞から切り離される。細胞膜に由来する。
マーカー分子	良く使われるもの：CD9, CD63, CD81, ALIX, TSG101 その他：HSP70, HSP90, RAB（GTPase, SNARE, Flotillin, MHC Ⅰ）	インテグリン、セレクチン、CD40[1]	アネキシンV

※表中の各マーカー分子は、すべての細胞外小胞に含まれるわけではありません。
※サイズによりさらに分ける方法（exomer：～35 nm, Exo-L：90 ～ 120 nm, Exo-S：60 ～ 80 nm）も存在します [1]。
※エクソソームとマイクロベシクルの直径は、2014 年に発表された細胞外小胞研究を行うためのガイドライン（Minimal information for studies of extracellular vesicles：MISEV）を元にしています。2018 年のガイドラインでは上記の表とは異なり、200 nm 以下のものを small Extracellular Vesicles（sEVs）, 200 nm 以上のものを medium/large EVs(m/l EVs)というように、由来ではなくサイズで分類するのが好ましいとされています。今後も情報が更新されていくと考えられます。

■ CD9, CD63, CD81（テトラスパニン）

エクソソームの生成は、まずエンドソームの内側にエクソソームの元となる腔内膜小胞（intraluminal vesicle ： ILV）[2] が形成されることから始まります。この時にテトラスパニン（CD9, CD63, CD81）という、エクソソーム膜を 4 回貫通する構造の膜タンパク質が関与し、これがエクソソームの表面マーカーとして広く利用されています。テトラスパニンは、エクソソームとして放出された後には、他の膜タンパク質と結合してコンプレックスを形成する働きをすることになります。

CD9 は樹状細胞由来のエクソソームからの同定 [3]、CD63 と CD81 は B リンパ球由来のエクソソーム内からの同定 [4] などから始まり、その後多くの研究に活用されてエクソソームのマーカーとして定着しています。テトラスパニンは円錐状ということもあり [5]、ILV を形成させる手段の一つとして、クラスター化により膜が湾曲して出芽が誘導され [6]、直接的に ILV 形成に関わっている可能性があります（ESCRT 非依存的な経路）[7]。ただし、CD9 は大きな小胞でも検出されているためにエンドソームの特定のマーカーとは言えず、また CD63 と CD81 は エクソソームに豊富に含まれていますが、細胞膜からの出芽を介して発生した小胞にも存在し、エクソソームと区別できない場合もあり、注意が必要です [8]。

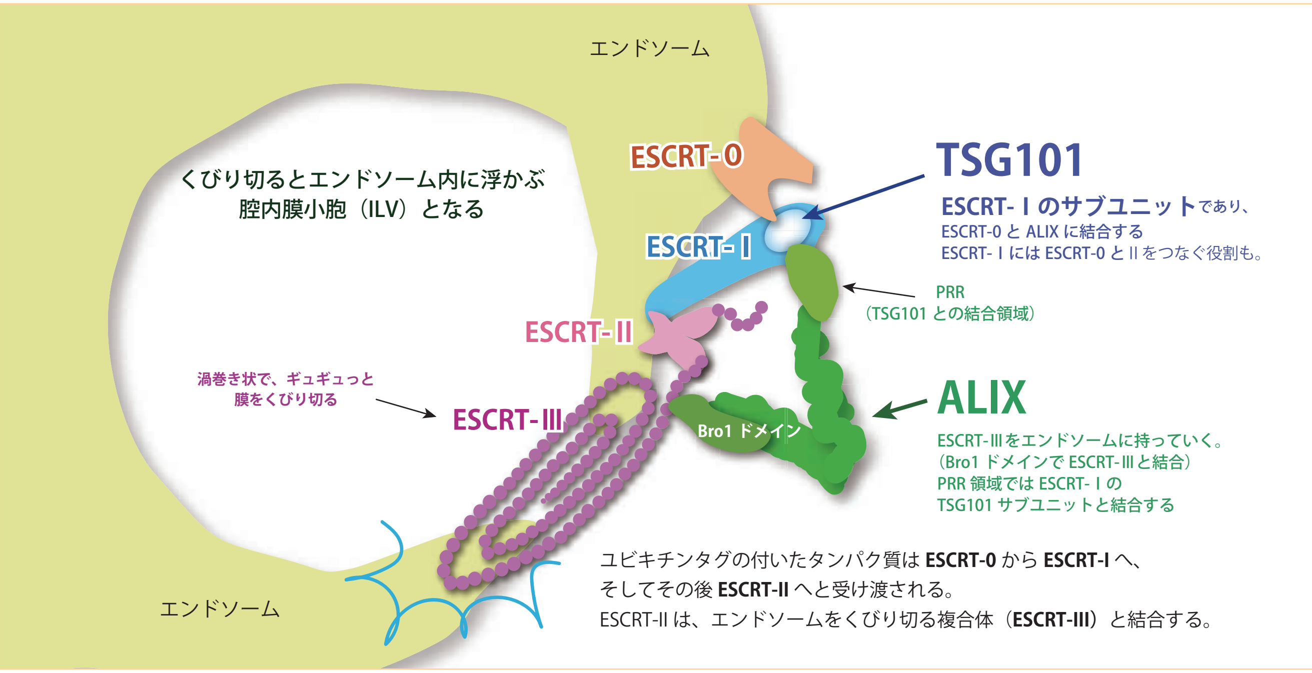
■ ALIX および TSG101（腔内膜小胞の形成に関わる分子）

腔内膜小胞が中に存在するエンドソームは、多胞性エンドソーム（Multi Vesicular Body, MVB）、もしくは後期エンドソーム（late endosome）と呼ばれます。多胞性エンドソームが細胞膜と融合することによって、腔内膜小胞が細胞外へ放出されることが発見され、エクソソーム（当初は "endosome-like vesicles" などと呼ばれていた）となります[9, 10, 11]。この多胞性エンドソームの発生に関連する分子として ALIX（ALG-2 interacting protein X）[12, 13] が有名で、良く用いられるエクソソームのマーカーです。

エクソソームの生成経路として、「ESCRT（endosomal sorting complex required for transport）に依存的な経路」があります。この経路では腔内膜小胞の形成に ESCRT-0、-I、-II、-III の 4 つの複合体が必要です[14]。ALIX は多胞体膜上に特異的に存在し、その働きの一つが ESCRT- Ⅲをエンドソームに持っていくことです[15]。エンドソーム表面に届けられた ESCRT- Ⅲは、リング状、渦巻き状のポリマーの形であることを利用して、膜の切り離しを媒介します[16]。

また、その前に腔内膜小胞に入れ込むカーゴを、エンドソームの膜表面に集めることが必要です。これには ESCRT-0 が、もう一つの有名なエクソソームマーカーである TSG101（腫瘍感受性遺伝子、tumor susceptibility gene 101）（ESCRT- Ⅰの構成要素）とともに働きます[17]。先ほどの ALIX は、N末端に Bro1 ドメイン、C末端にプロリンリッチ領域（PRR 領域）を有します[18]が、ALIX の PRR 領域は TSG101 に結合し[19]、ALIX の Bro1 ドメインは ESCRT- Ⅲと相互作用します[19, 20, 21]。このように「ESCRT に依存的な経路」の場合は、ALIX と TSG101 は膜の切り離し時に腔内膜小胞に取り込まれるので、エクソソーム内にも含まれ、エクソソームマーカーとして利用されています。

エクソソームの形成には ESCRT 非依存的な経路も存在します[22]。このようにエクソソームの生成には複数の経路があるためか、ALIX と TSG101 も、全てのエクソソームに存在するマーカーではなく、絶対的ではありません。



※他にも Syndecan、Syntenin1、ユビキチン化した Cargo など様々な分子が作用します。図では一部を掲載しています。
※文献 18, 23, 24, 25, 26, 27, 28, を参考に作成した図です。
※タンパク質や腔内膜小胞の大きさの比率は、実際と異なります。

■ その他のマーカータンパク質

EpCAM（上皮細胞接着分子：epithelial cell adhesion molecule）は、移行上皮および単層上皮に特異的な細胞間の接着分子として機能しますが、固形腫瘍の多くは上皮系細胞から発生するため、様々な種類のがん腫で高度に発現し、エクソソームのカーゴタンパク質（cargo protein）として同定されています[29]。これに着目してエクソソーム上の EpCAM は卵巣がんの診断マーカーとして利用する研究も進められています[30, 31, 32]。

その他、多くの細胞由来のエクソソームに共通するタンパク質として、ヒートショックタンパク質（HSP70、HSP90）[33]、膜輸送と融合に関わる RAB（GTPase）[34, 35]、MVB がエクソソームとして分泌される前に細胞膜との融合にかかわる SNARE[36, 37]、脂質ラフトマーカータンパク質でもある Flotillin[38]、MHC 分子[39, 40] を発現しています。マイクロベシクルのマーカーはエクソソームほど研究が進められていませんが、インテグリン、セレクチン、CD40 などがマーカーとして用いられています[41, 42]。

エクソソームの存在する場所や時期、内包する内容物の違いなどによりこれらのマーカーの発現が異なることが報告されています。どのような状況下でどのようなマーカーが発現しているかを調べることは、治療用エクソソームの品質管理、新規がんマーカーや疾患マーカーの発見、およびそれを利用した迅速診断技術など、エクソソームの特徴を明らかにすることについて非常に有意義な知見を得ることになります。

参考文献

1) H. Zhang, *et al*., Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric-flow field-flow fractionation, *Nat. Cell Biol*., 2018, 20, 332-343.

2) Willem Stoorvogel *et al*., The biogenesis and functions of exosomes, *Traffic*, 2002 May;3(5):321-30. doi: 10.1034/j.1600-0854.2002.30502.x.

3) Thery C, *et al*., Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* (1999) 147(3):599–610. doi:10.1083/jcb.147.3.599

4) J M Escola *et al*., Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes, *J Biol Chem*. 1998 Aug 7;273(32):20121-7. doi: 10.1074/jbc.273.32.20121.

5) Brandon Zimmerman *et al*., Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket, *Cell Volume* 167, Issue 4, 3 November 2016, Pages 1041-1051.e11

6) 今見考志ら　細胞外小胞のプロテオームプロファイリング　実験医学 vol.39 No.20（増刊）2021 p32

7) Guillaume van Niel *et al*., The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis, *Dev Cell*. 2011 Oct 18;21(4):708-21. doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.019. Epub 2011 Sep 29.

8) Zoraida Andreu and María Yáñez-Mó*, Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function, *Front. Immunol.*, 16 September 2014 Sec. Vaccines and Molecular Therapeutics Volume 5 - 2014 | https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442

9) C Harding, *et al*., Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes, *J Cell Biol* (1983) 97 (2): 329–339. https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329

10) Carl-Henrik von Bonsdorff *et al*., Apical and basolateral endocytosis in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells grown on nitrocellulose filters, *EMBO J*. 1985 Nov; 4(11): 2781–2792. doi: 10.1002/j.1460-2075.1985.tb04004.x

11) Perez-Gonzalez R *et al*., (2012). The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space, *J Biol Chem*, 287(51), 43108–43115. doi: 10.1074/jbc.M112.404467

12) Charles Géminard *et al*., Degradation of AP2 During Reticulocyte Maturation Enhances Binding of Hsc70 and Alix to a Common Site on TfR for Sorting into Exosomes, *Traffic* Volume 5, Issue 3 March 2004 pages 181-193 https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.0167.x

13) Theos, A.C., *et al*., 2006. A lumenal domain-dependent pathway for sorting to intralumenal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis, *Dev. Cell.* 10:343–354.

14) Williams, R.L., and S. Urbé. 2007. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:355–368.

15) Jorge Larios, *et al*., ALIX- and ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes, *J Cell Biol.* 2020 Mar 2;219(3):e201904113. doi: 10.1083/jcb.201904113.

16) Manuel Alonso Y Adell, Assembly and disassembly of the ESCRT-III membrane scission complex, *FEBS Letters* Volume 585, Issue 20 Oct 2011 Page, 3147-3353

17) M. Razi and C. E. Futter, Distinct Roles for Tsg101 and Hrs in Multivesicular Body Formation and Inward Vesiculation, *Mol Biol Cell*. 2006 Aug; 17(8): 3469–3483. doi: 10.1091/mbc.E05-11-1054

18) Fisher R.D., *et al*., 2007. Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding, *Cell*. 128:841–852. 10.1016/j.cell.2007.01.03

19) Strack, B., *et al*., 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, 114:689–699. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00653-6

20) Zhai, Q., *et al*., 2011. Activation of the retroviral budding factor ALIX, *J. Virol*. 85:9222–9226. https://doi.org/10.1128/JVI.02653-10

21) Zhou, X., *et al*., 2008. The HIV-1 p6/EIAV p9 docking site in Alix is autoinhibited as revealed by a conformation-sensitive anti-Alix monoclonal antibody, *Biochem. J*. 414:215–220. https://doi.org/10.1042/BJ20080642

22) Houssam Aheget *et al*., Exosome: A New Player in Translational Nanomedicine, *J. Clin. Med*. 2020, 9(8), 2380; https://doi.org/10.3390/jcm9082380

23) Eiji Morita *et al*., Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis, November 2007 *The EMBO Journal* 26(19):4215-27 DOI:10.1038/sj.emboj.7601850

24) Robert D. *et al*., Structural and Biochemical Studies of ALIX/AIP1 and Its Role in Retrovirus Budding, November 2007 *The EMBO Journal* 26(19):4215-27 DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.035

25) William M., *et al.,* The ESCRT Pathway, *Developmental Cell Review* DOI 10.1016/j.devcel.2011.05.015

26) Mehrshad Pakdel, The dynamic assembly and disassembly of the ESCRT machinery, *Austrian Marshall Plan Scholarship Research Paper* December 2014

27) Tassilo Hornung *et al*., ADAPT identifies an ESCRT complex composition that discriminates VCaP from LNCaP prostate cancer cell exosomes, January 2020 *Nucleic Acids Research* 48(8) DOI:10.1093/nar/gkaa034

28) Shaogeng Tang *et al*., ESCRT-III activation by parallel action of ESCRT-I/II and ESCRT-0/Bro1 during MVB biogenesis, *eLife* 2016;5:e15507. DOI: 10.7554/eLife.15507

29) Taylor DD, *et al*., MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer, *Gynecologic Oncology*, 2008 Jul;110(1):13-21. PMID: 18589210

30) Beach A, *et al*., Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer, *J Ovarian Res*. 2014 Jan 25;7:14. PMID: 24460816 3)

31) Runz S, *et al*., Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM, *Gynecologic Oncology* 2007 Dec;107(3):563-71. PMID: 17900673

32) Xiangjin Gong *et al*., Exosomes: A potential tool for immunotherapy of ovarian cancer, *Front. Immunol*., 18 January 2023 Sec. Cancer Immunity and Immunotherapy Volume 13 - 2022 | https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1089410

33) Wubbolts R., *et al.*, 2003. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem*. 278:10963–10972. https://doi.org/10.1074/jbc.M207550200

34) Y. Yoshioka *et al*., Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types, *Journal of extracellular vesicles* 2, 1-9 (2013).

35) Blanc L, Vidal M., New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion, *Small GTPases*. 2018;9(1–2):95–106.

36) Sofia V. Krylova *et al*., The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake *Int. J. Mol. Sci*. 2023, 24(2), 1337; https://doi.org/10.3390/ijms24021337

37) Somya Vats and Thierry Galli, Role of SNAREs in Unconventional Secretion—Focus on the VAMP7-Dependent Secretion, *Front. Cell Dev. Biol*., 16 June 2022 Sec. Membrane Traffic Volume 10 - 2022 | https://doi.org/10.3389/fcell.2022.884020

38) Aude de Gassart *et al*., Lipid raft-associated protein sorting in exosomes, *Blood* Volume 102, Issue 13, 15 December 2003, Pages 4336-4344, https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0871

39) Monique Kleijmeer *et al*., Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells, *J Cell Biol.* 2001 Oct 1; 155(1): 53–64.doi: 10.1083/jcb.200103071

40) G Raposo, *et al*., B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles, *J Exp Med* (1996) 183 (3): 1161-1172. https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161

41) Zhu S *et al*., Roles of Microvesicles in Tumor Progression and Clinical Applications, International, *Journal of Nanomedicine* 18 October 2021 Volume 2021:16 Pages 7071-7090 DOI https://doi.org/10.2147/IJN.S325448

42) Fariborz Mobarrez *et al*., The expression of microvesicles in the blood of patients with Graves' disease and its relationship to treatment, May 2016 *Clinical Endocrinology* 84(5):729-35 DOI:10.1111/cen.12872

エクソソームモノクローナル抗体（Anti CD9, CD63, CD81）

コスモ・バイオ株式会社

エクソソーム研究のゴールドスタンダード

エクソソームマーカーとして知られている CD9、CD63、CD81 を特異的に認識する抗体で、血清、培養上清から免疫沈降法を用いて、エクソソームを単離することができる抗体です。
新たに Tide Fluor™ 2WS 修飾抗体がラインアップに追加されました。
日本国内特許成立済み

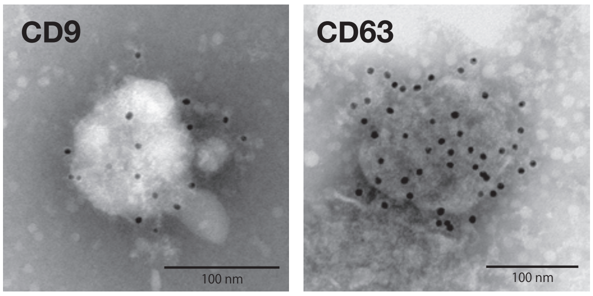


図 1　抗ヒト CD9 および抗ヒト CD63 抗体によって標識されたヒト乳がん細胞株由来 EV の免疫電子顕微鏡画像
抗ヒト CD9 抗体（品番：SHI-EXO-M01）および抗ヒト CD63 抗体（品番：SHI-EXO-M02）により、ヒト乳がん細胞株（MDA-MB-231-luc-D3H2LN）由来の細胞外小胞（EV）表面上の CD9 および CD63 分子を検出した。
データ提供：国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野　西田 奈央 先生

特長

- ●エクソソーム膜タンパク質 CD9、CD63、CD81 を高い特異性で認識
- ●エクソソーム表面抗原タンパク質、内在性 RNA（miRNA）、タンパク質解析に有用
- ●CD9 はウシミルクエクソソーム、CD81 はウシミルクエクソソーム、FBS でも検出確認済み

対応サンプル	
CD9	血清、血漿、培養上清、尿
CD63	血清、血漿、培養上清、尿
CD81	血清、血漿、培養上清
アプリケーション	
CD9/CD63/CD81 共通	
WB、IP、ELISA、Flowcytometry、Electron microscopy、Immunofluorescence	

表
WB：ウエスタンブロット、IP：免疫沈降

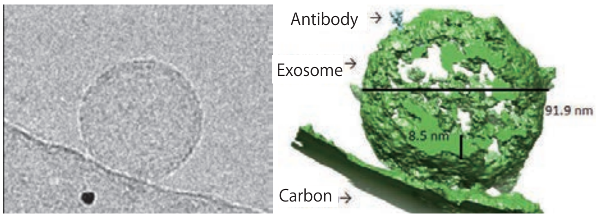


図 2　クライオ電子顕微鏡像によるエクソソームと抗ヒト CD63 抗体（clone 8A12）の検出
エクソソームと抗ヒト CD63 抗体（clone 8A12）を混合し、クライオ電子顕微鏡 Titan Krios で撮影した（左）。撮影画像を 3 次元構築したものが（右）である。

研究者が使ってみました！
Application Note
あります！

ユーザーからのレポートである Application Note を次ページに掲載しています。

A　B

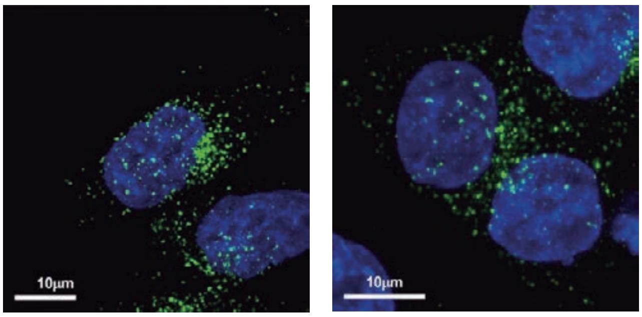


図 3　前立腺がん細胞 PC-3M および大腸がん細胞 HCT116 における CD63 の局在
A：前立腺がん細胞 PC-3M
B：大腸がん細胞 HCT116
二次抗体に Alexa Fluor® 488 標識抗マウス二次抗体を使用した。
データ提供：
国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野
東京医科大学産学連携講座細胞外小胞創薬研究講座
小坂 展慶 先生

製品使用文献

■ **CD9**
S Tsuda *et al*., *Sci Rep*. 2017 Oct 11;**7**(1):12989.
N Nishida-Aoki *et al*., *Mol Ther*. 2017 Jan 4;**25**(1):181-191.
K Matsuzaki *et al*., *Oncotarget*. 2017 Apr 11; **8**(15): 24668-24678.
Kazutoshi Fujita *et al*., *Sci Rep*. 2017; 7: 42961.
Yoshioka Y *et al*., *Nat Commun*. 2014 Apr 7;5:3591.
Saito S *et al*., *Sci Rep*. 2018 Mar 5;**8**(1):3997.
Yagi Y *et al*., *Neurosci Lett*. 2017 Jan 1;636:48-57.
Ueda K *et al*., *Sci Rep*. 2014 Aug 29;4:6232.

■ **CD63**
N Nishida-Aoki *et al*., *Mol Ther*. 2017 Jan 4;**25**(1):181-191.
Yoshioka Y *et al*., *Nat Commun*. 2014 Apr 7;**5**:3591.
Saito S *et al*., *Sci Rep*. 2018 Mar 5;**8**(1):3997.

■ **CD81**
M Somiya *et al*., *J Extracell Vesicles*. 2018 Feb 21;**7**(1):1440132.
Takahashi A *et al*., *Nat Commun*. 2017 May 16;**8**:15287.

［コスモ・バイオ株式会社　メーカー略号：CAC］

品名	標識	免疫動物（クローン）	種由来	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti CD9	非標識	Mouse（12A12）	Human	SHI-EXO-M01	100 μL（1 mg/mL）	¥65,000	凍
Anti CD63		Mouse（8A12）	Human	SHI-EXO-M02	100 μL（1 mg/mL）	¥65,000	凍
Anti CD81		Mouse（12C4）	Human	SHI-EXO-M03	100 μL（1 mg/mL）	¥65,000	凍
Anti CD9	Biotin	Mouse（12A12）	Human	SHI-EXO-M01-B	100 μL（1 mg/mL）	¥85,000	凍
Anti CD63		Mouse（8A12）	Human	SHI-EXO-M02-B	100 μL（1 mg/mL）	¥85,000	凍
Anti CD81		Mouse（12C4）	Human	SHI-EXO-M03-B	100 μL（1 mg/mL）	¥85,000	凍
Anti CD9	Tide Fluor™ 5WS	Mouse（12A12）	Human	SHI-EXO-M01-TF5	100 μL（1 mg/mL）	¥85,000	凍
Anti CD63		Mouse（8A12）	Human	SHI-EXO-M02-TF5	100 μL（1 mg/mL）	¥85,000	凍
Anti CD81		Mouse（12C4）	Human	SHI-EXO-M03-TF5	100 μL（1 mg/mL）	¥85,000	凍
Anti CD9	Tide Fluor™ 2WS	Mouse（12A12）	Human	SHI-EXO-M01-TF2	100 μL（1 mg/mL）	¥85,000	凍
Anti CD63		Mouse（8A12）	Human	SHI-EXO-M02-TF2	100 μL（1 mg/mL）	¥85,000	凍
Anti CD81		Mouse（12C4）	Human	SHI-EXO-M03-TF2	100 μL（1 mg/mL）	¥85,000	凍

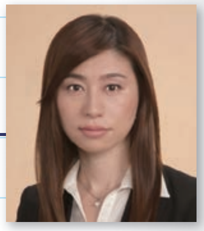
※蛍光標識アイソタイプコントロールもご用意しています。詳細はコスモ・バイオの Web をご覧ください。 記事ID 11015 検索
※バルクサイズでの供給も可能です。

研究者が使ってみました！

Application Note あぷりけーしょんのーと

抗 CD81 抗体を用いた Western blotting 法によるエクソソーム蛋白の検出

ユーザーレポート 高橋 暁子 Takahashi Akiko
公益財団法人がん研究会　がん研究所　細胞老化プロジェクト



Products

● Anti CD81, Human (Mouse) Unlabeled, 12C4
品番：SHI-EXO-M03　コスモ・バイオ株式会社　メーカー略号：CAC

エクソソームは、後期エンドソームに ESCRT 複合体やセラミド合成酵素によって腔内小胞が形成された多胞性エンドソーム（Multivesicular body）を経て、細胞外へと分泌される直径 50-150nm 程の細胞外膜小胞である。蛋白質、脂質、核酸のような様々な細胞内構成分子がエクソソームによって他の細胞に伝達されることから、近年エクソソームが細胞間コミュニケーションツールとして働いていることが報告され大変に注目を集めている。
私たちは老化細胞が炎症性サイトカインやケモカインなどの炎症性蛋白質を高発現し細胞外へと分泌する SASP（Senescence-associated secretory phenotype）の解析を行う過程で、老化細胞は炎症性蛋白質だけではなく細胞外分泌膜小胞の一種であるエクソソームの分泌も亢進していることを見出した[1)]。ヒト正常線維芽細胞を用いて分裂寿命による細胞老化（Replicative senescence）と活性化型がん遺伝子（RasV12）による細胞老化（Oncogene-induced senescence）を誘導し、あらかじめ血清中のエクソソーム画分を除去した培地で 48 時間培養後に、培養上清中のエクソソームを超遠心法で回収した。そして細胞が分泌するエクソソームの量を NTA 法（Nanoparticle Tracking Analysis 法）で計測したところ、老化細胞ではエクソソームの分泌量が若い細胞の約 30 ～ 50 倍亢進していることが明らかとなった（図 1、上段）。さらに細胞が分泌したエクソソームマーカー蛋白の量を比較解析するために、回収したエクソソーム画分を用いて Western blotting を行った。この時、コスモ・バイオ社から発売されている抗ヒト CD81 モノクローナル抗体（SHI-EXO-M03）を 1:1000 希釈で使用したところ、老化細胞では若い細胞に比べて明らかにエクソソーム蛋白質の分泌量が増加していることが確認された（図 1、下段）。私たちは老化細胞で分泌量が亢進しているエクソソームは、乳がん細胞（MCF-7）の増殖促進作用を示すことも観察している[2)]。

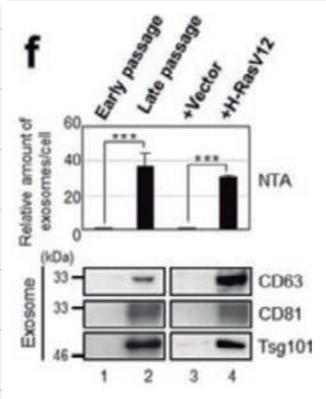


図 1　ヒト正常線維芽細胞（TIG-3）が分泌するエクソソームの解析 *1
NTA 法によるエクソソームの測定結果と Western blotting 法によるエクソソームマーカー蛋白の検出。

エクソソームはこれまで、その細胞間コミュニケーションツールとしての機能や診断ツールとしての有用性が特に注目され研究が進んできたが、細胞が何故エクソソームを分泌するのか、その生物学的な意義についてはまだまだ未知の部分が多い。私たちは正常な細胞がエクソソームを分泌する詳細な分子メカニズムを解析することで、エクソソーム分泌の生物学的意義を明らかにしたいと考えている。さらに、老化細胞が分泌する SASP 因子としてのエクソソームの機能を解析することで、エクソソームが生体内で果たす役割やがんをはじめとする加齢性疾患とエクソソームの関りを解明したい。

1) Takahashi, A. *et al.* Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun* **8**, 15287 (2017).
2) Takasugi, M. *et al.* Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nat Commun* **8**, 15729 (2017).

品名	品番	包装	希望販売価格
Anti CD81, Human (Mouse) Unlabeled, 12C4	SHI-EXO-M03	100 µL [1 mg / mL]	¥65,000

メーカー：コスモ・バイオ株式会社　メーカー略号：CAC

敬称は省略させていただきます

エクソソームマーカー抗体 ▶▶▶ CD 検出抗体

WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 36082

CD91（LRP1）抗体

コスモ・バイオ株式会社

エクソソーム研究に

背景

LDL Receptor-Related Protein（LRP1、CD91）[1] は、ミエリン関連糖タンパク質（MAG）[2] の高親和性エンドサイトーシス受容体として、リガンドに結合してシグナル伝達特性を示し [3]、リポタンパク質代謝、プロテアーゼの分解、リソソーム酵素の活性化、細菌毒素とウイルスの細胞侵入 [4] などの多様な分野で役割を果たすことが知られています。

CD91（LRP1）は、潜在的な NSCLC（非小細胞肺がん）のエクソソームマーカーである可能性が示されています [5]。CD91（LRP1）の発現は肺がんの転帰の改善と関連し [6]、アゴニストは脊髄損傷後の再生を促進します [7]。

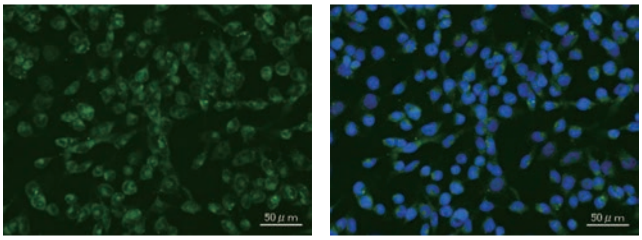


図　SJRH30 細胞株の免疫染色画像
サンプル：SJRH30 細胞株
一次抗体：anti-CD91（B3-3E11）抗体（10 μg/mL）
二次抗体：Anti-Mouse IgG-Alexa Fluor 488 抗体（8 μg/mL）
核染色：Hoechst 33342（緑色：抗体、青色：染色された核）

参考文献

1) Herz J, *et al*., *EMBO J*. 1988 Dec 20;7(13):4119-27. PMID: 3266596.
2) Stiles TL, *et al*., *J Cell Sci*. 2013 Jan 1;126(Pt 1):209-20. PMID: 23132925.
3) Etique N, *et al*., *Biomed Res Int*. 2013:152163. PMID: 23936774
4) Lillis AP, *et al*., *J Thromb Haemost*. 2005 Aug;3(8):1884-93. PMID: 16102056
5) Huang SH, *et al*., *Cancer Invest*. 2013;31: 330–335. PMID: 23614656
6) Meng H, *et al*., *Clin Cancer Res*. 2011 Apr 15;17(8):2426-33. PMID: 21325077
7) Yoon C, *et al*., *J Biol Chem*. 2013 Sep 13;288(37):26557-68. PMID: 23867460

［コスモ・バイオ株式会社　メーカー略号：CAC］

品名	免疫動物（クローン）	交差種	適用	抗体クラス	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti CD91 (LRP1)	Mouse（B3-3E11）	Human	WB, IS	IgG1κ	SHI-EXO-M04	100 μL	¥50,000	凍

エクソソームマーカー抗体 ▶▶▶ その他エクソソーム抗体

WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 36083

EpCAM 抗体

コスモ・バイオ株式会社

エクソソームの cargo protein の検出や卵巣がんの研究に

背景

EpCAM（上皮細胞接着分子：epithelial cell adhesion molecule）は、偽重層上皮の一種である移行上皮および単層上皮に特異的な細胞間の接着分子としてホモフィリック結合様式で機能する糖タンパク質です。固形腫瘍の多くは上皮系細胞から発生するため、様々な種類のがん腫で高度に発現し、エクソソームの cargo protein として同定されています [1]。

EpCAM 陽性循環腫瘍エクソソーム（もしくは循環腫瘍細胞由来 EpCAM 陽性エクソソーム）を用いた miRNA プロファイリングは、生検時の診断マーカーとして自覚症状のないがん患者の診断に利用できる可能性が示唆されています [2]。さらに、卵巣腫瘍由来エクソソームにおけるマイクロ RNA、EpCAM および CD24 の存在に関する最近の発見は、卵巣がんの早期検出のために非常に有望であると考えられています [2～4]。

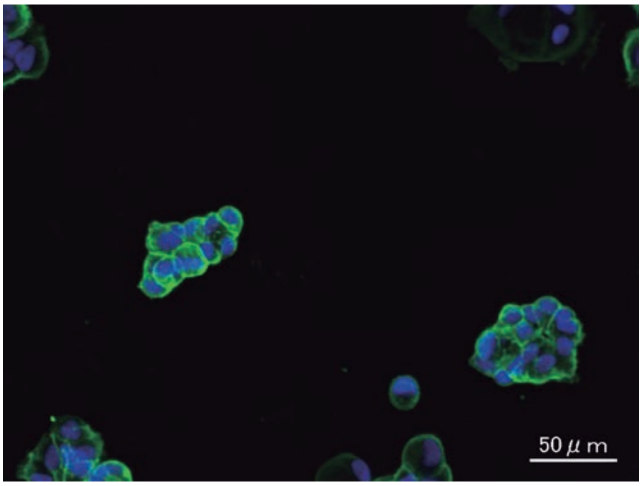


図　ZR-75-1 細胞株の免疫染色画像
サンプル：ZR-75-1 細胞株
一次抗体：Anti-EpCAM（BT-11C5）抗体（10 μg/mL）
二次抗体：Anti-Mouse IgG-Alexa Fluor 488 抗体（8 μg/mL）
核染色：Hoechst 33342（緑色：抗体、青色：染色された核）

参考文献

1) Taylor DD, *et al*., *Gynecologic Oncology*, 2008 Jul;110(1):13-21. PMID: 18589210
2) Beach A, *et al*., *J Ovarian Res*. 2014 Jan 25;7:14. PMID: 24460816
3) Runz S, *et al*., *Gynecologic Oncology* 2007 Dec;107(3):563-71. PMID: 17900673
4) Rupp AK, *et al*., *Gynecologic Oncology* 2011 Aug;122(2):437-46. PMID: 21601258

［コスモ・バイオ株式会社　メーカー略号：CAC］

品名	免疫動物（クローン）	交差種	適用	抗体クラス	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti EpCAM	Mouse（BT-11C5）	Human	WB, IS	IgG1κ	SHI-EXO-M05	100 μL	¥50,000	凍

エクソソーム研究用のその他抗体

■モノクローナル抗体

品名，標識	種由来	免疫動物（クローン）	交差種	適用	サブクラス	精製	メーカー	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti Alix	HU	MS（1A12）	HU, MS	WB, IHC(p), IHC(f), ELISA, IF, IP	IgG1κ	Affi	SCB	SC-53540	200 μg	¥65,000	㊆冷
Anti CD9	HU	MS Mono		WB, FACS, ELISA, IP, IHC			HNB	HBM-CD9-100	100 μg (1.0 mg/mL)	¥90,000	冷
Anti CD9, Biotin 標識	HU	MS Mono		WB, ELISA, IP			HNB	HBM-CD9B-100	100 μg (1.0 mg/mL)	¥120,000	冷
Anti CD41a	HU	MS（HIP8）	HU, NHP	FC	IgG2b	Ig-PA	PGI	65173-1-IG	100 μg	¥13,000	冷
Anti CD41, Integrin α 2b	HU	MS (6D7C5)	HU	WB, ELISA	IgG1	Ig-PG	PGI	60350-1-IG	150 μL	¥67,000	凍
Anti Integrin alpha-IIb (CD41)	HU	MS（Q90）		WB, IHC(p), IHC(f)	IgG1		HCB	HM2343-100UG	100 μg	¥63,000	冷
Anti CD41-EM1	HU	MS Mono		FACS, ELISA			HNB	HBM-CD41-EM1-100	100 μg (0.5 mg/mL)	¥90,000	冷
Anti CD44	HU	MS (6F4H2)	HU, MS, RT, POR	WB, IHC(p), ELISA, IF, FC	IgG2a	Ig-PA	PGI	60224-1-IG	150 μL	¥67,000	凍
		MS (F10-44-2)	HU	FC	IgG2a	Affi	PGI	65063-1-IG	100 μg	¥14,000	冷
	MS	RT（IM7）	HU, MS	FC	IgG2b	Ig-PA	PGI	65117-1-IG	100 μg	¥17,000	冷
Anti CD44v9	HU	RT（RV3）	HU	WB, IHC(p), IF, ELISA, FC, IP	IgG2a	Ig-PG	CAC	LKG-M003	50 μg	¥60,000	冷
Anti CD44v10-e16	MS	RT（RM1）	MS	FC	IgG2a	Ig-PG	CAC	LKG-M002S	50 μg	¥60,000	冷
Anti CD44-EM1	HU	MS Mono		WB, ELISA, IP			HNB	HBM-CD44-EM1-100	100 μg (0.5 mg/mL)	¥90,000	冷
Anti CD63	HU	MS Mono		WB, FACS, ELISA, IP, IHC			HNB	HBM-CD63-100	100 μg (1.0 mg/mL)	¥90,000	冷
Anti CD81-EM4	HU	MS Mono		WB, FACS, ELISA, IP, IHC			HNB	HBM-CD81-EM4-100	100 μg (1.0 mg/mL)	¥90,000	冷
Anti HSP70	HU	MS(4E7E5)	HU, MS, RT, YST	WB, IHC(p), ELISA, IF, FC, Co-IP	IgG1	Ig-PA	PGI	66183-1-IG	150 μL	¥67,000	凍
		MS（W27）	HU, MS, RT	WB, IHC(p), IHC(f), IF, FC, IP	IgG2aλ	Affi	SCB	SC-24	200 μg	¥65,000	冷
Anti HSP70, Recombinant	HU	RAB (4E10)	HU, MS, RT, YST	WB, IHC(p), ELISA, IF	IgG	Ig-PA	PGI	80735-1-RR	100 μL	¥85,000	凍
Anti TIM-4	MS	AM (Kat5-18)		IF, FC, IA, FA	IgG		HCB	HM1111-100UG	100 μg	¥45,000	冷
	HU	MS（G-6）	HU	WB, IHC(f), ELISA, IF, IP	IgG1κ		SCB	SC-390805	200 μg	¥65,000	冷
Anti TIM-4, FITC 標識	MS	AM (Kat5-18)		IF, FC, IA, FA	IgG		HCB	HM1111F-100UG	100 μg	¥56,000	冷
Anti TSG101	HU	MS（51）	HU, MS, RT, CAN	WB, IP	IgG1		SCB	SC-136111	200 μg	¥65,000	冷
		MS (2B7G8)	HU, MS, RT	WB, IHC(p), ELISA, IF, FC	IgG1	Ig-PG	PGI	67381-1-IG	150 μL	¥67,000	凍

■ポリクローナル抗体

物質名	種由来	免疫動物	交差種	適用	サブクラス	精製	メーカー	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti CD41, Integrin α 2b	HU	RAB	HU, MS, RT, POR	WB, IHC(p), ELISA, IF, IP	IgG	Affi	PGI	24552-1-AP	150 μL	¥67,000	凍
			HU, MS, RT	WB, IHC(p), ELISA, IF				18308-1-AP	150 μL	¥67,000	凍
Anti CD44	HU	RAB	HU, MS, RT, BOV	WB, IHC(p), ELISA, IF, FC, IP, Co-IP	IgG	Affi	PGI	15675-1-AP	150 μL	¥67,000	凍
Anti CD44, CL 594 標識	HU	RAB	HU, MS, RT	IF	IgG	Affi	PGI	CL594-15675	100 μL	¥84,000	凍
Anti Flotillin	HU	RAB		WB, FACS, ELISA			HNB	HBM-FLOT-SR1-100	100 μg (0.2 mg/mL)	¥120,000	冷
Anti HSP70	HU	RAB	HU, MS, RT, BOV, POR, *C. e*, OY	WB, IHC(p), ELISA, IF, FC, IP, Co-IP	IgG	Affi	PGI	10995-1-AP	150 μL	¥67,000	凍
			HU, MS, RT	WB, ELISA, IP	IgG	Affi	PGI	25405-1-AP	150 μL	¥67,000	凍
				WB, FACS, ELISA			HNB	HBM-HSP70-SR1-100	100 μg (0.5 mg/mL)	¥120,000	冷
Anti RAB5	HU	RAB		WB, FACS, ELISA, IP			HNB	HBM-RAB5-PR1-100	100 μg (0.2 mg/mL)	¥103,000	凍
Anti TSG101	HU	RAB	HU, MS, RT, GT	WB, IHC(p), ELISA, IP	IgG	Affi	PGI	28283-1-AP	150 μL	¥67,000	凍

IP = Immunoprecipitation, FC = Flow Cytometry, WB = Western Blot, IHC(f) = IHC frozen section, IHC(p) = IHC paraffin embedding section, IA = Immuno Assay, FA = Functional Assay

AM = American Hamster, BOV = Bovine, CAN = Canine, HU=Human, MS = Mouse, OY = Oyster, POR = Porcine, RT = Rat, RAB = Rabbit, YST = Yeast, *C. e* = *C.elegans*

こちらに掲載したのは、コスモ・バイオで販売しているエクソソーム関連抗体のごく一部です。他のメーカーの抗体や、上記に掲載している抗体の標識品なども販売しています。
コスモ・バイオで取り扱っている抗体は、Web 上の「抗体百科」で検索することが可能です。

その他フローサイトメトリー用抗体は、85 ページでもご紹介しています。

プロテインテック社　エクソソーム研究用抗体

proteintech®

エクソソームについては多くのことが未解明となっています。プロテインテックは、エクソソーム研究をサポートする有用なマーカー抗体を幅広く取り揃えています。以下のリストには、エクソソーム研究によく用いられるマーカーを掲載しています。

■Alix

AIP1 または Hp95 としても知られる ALG-2 相互作用タンパク質 1（ALIX）は、PDCD6IP 遺伝子によってコードされ、その結合パートナーである ALG-2（アポトーシス関連遺伝子 2）が関与する機構を通じて細胞死に関与します。ALIX は、C 末端のプロリンに富む領域を通じて ALG-2 と相互作用し、多胞体の形成に関与します。

[Proteintech Group, Inc.　　メーカー略号：PGI]

品名	種由来	免疫動物（クローン）	交差種	適用	サブクラス	精製	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti Alix	HU	Mouse（1H9D9）	HU, MS, RT	WB, ELISA, IF	IgG1	Ig-PA	67715-1-IG	150 μL	¥67,000	㊐凍
		Rabbit poly		WB, IP, IHC, IF, ELISA	IgG	Affi	12422-1-AP	150 μL	¥67,000	凍

■Annexin V

アネキシン A5（ANXA5）は、アネキシンタンパク質ファミリーのメンバーであり、その一部はエキソサイトーシスおよびエンドサイトーシス経路に沿った膜関連イベントに関与しています。アネキシン 5 は、カルシウムチャネル活性を備えたホスホリパーゼ A2 およびプロテインキナーゼ C 阻害タンパク質であり、細胞シグナル伝達、炎症、成長および分化において潜在的な役割を果たします。

[Proteintech Group, Inc.　　メーカー略号：PGI]

品名	種由来	免疫動物（クローン）	交差種	適用	サブクラス	精製	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti Annexin V	HU	Mouse（1E6A8）	HU, MS	WB, IHC, IF, FC, ELISA	IgG1	Ig-PG	66245-1-IG	150 μL	¥67,000	凍

■Calnexin

カルネキシンは、小胞体に存在する分子シャペロンで、新しく合成されたタンパク質のフォールディングとアセンブリに関与します。カルネキシンは ER に非常に豊富に存在し、ER マーカーとして頻繁に使用されます。

[Proteintech Group, Inc.　　メーカー略号：PGI]

品名	種由来	免疫動物（クローン）	交差種	適用	サブクラス	精製	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti Calnexin	HU	Mouse（2A2C6）	HU, MS, RT	IF	IgG1	Ig-PG	CL488-66903	100 μL	¥83,000	凍

■CD9

CD9 は、テトラスパニンスーパーファミリーのメンバーです。これは、多種多様な造血細胞および非造血細胞で発現されます。CD9 はインテグリンファミリーや他の膜タンパク質と相互作用し、細胞接着、細胞運動性、腫瘍転移に関与します。CD9 の発現は筋細胞間の膜融合を促進し、筋管の維持をサポートします。卵母細胞では、CD9 が哺乳類の受精に役割を果たしていると仮説が立てられています。

[Proteintech Group, Inc.　　メーカー略号：PGI]

品名	種由来	免疫動物（クローン）	交差種	適用	サブクラス	精製	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti CD9	HU	Mouse（MM2/57）	HU, RT	FC	IgG2b	Affi	FITC-65070	100 tests	¥28,000	冷

■CD63

CD63 は血小板の活性化後に細胞膜に移行するリソソーム膜糖タンパク質です。免疫 - 生理学的機能において多くの重要な役割を果たします。活性化血小板上に発現するため、血小板活性化マーカーとして機能する可能性があります。CD63 は、CD63 は黒色腫の初期段階で高度に発現し、進行した病変では減少するため、腫瘍進行の抑制因子である可能性が示唆されています。

[Proteintech Group, Inc.　　メーカー略号：PGI]

品名	種由来	免疫動物（クローン）	交差種	適用	サブクラス	精製	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti CD63	HU	Rabbit poly	HU, POR, CAN, Zebrafish	WB, IHC, IF, FC, ELISA	IgG2	Affi	25682-1-AP	150 μL	¥67,000	凍

■CD81

CD81（TAPA1 または TSPAN28 としても知られる）は、テトラスパニンスーパーファミリーの膜タンパク質です。これらのメンバーの多くは白血球で発現しています。CD81 は、免疫系におけるシグナル伝達と細胞接着に関与しています（PMID：9597125）。また CD81 は、HCV（C 型肝炎ウイルス）感染に重要な受容体であると考えられています（PMID：21428934）。

[Proteintech Group, Inc.　　メーカー略号：PGI]

品名	種由来	免疫動物（クローン）	交差種	適用	サブクラス	精製	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti CD81	HU	Mouse（1G2C6）	HU, POR	WB, IHC, IF, FC, ELISA	IgG1	Ig-PA	66866-1-IG	150 μL	¥67,000	凍

次のページへ続く

■EPCAM/CD326

細胞間細胞接着分子として機能するⅠ型膜貫通糖タンパク質です。細胞接着に加えて、EpCAMは細胞シグナル伝達、細胞遊走、増殖、分化にも関与しています。EpCAMは多くのがん細胞で高い発現を示しており、様々ながん腫の診断マーカーおよび予後マーカーとして使用できる可能性があり、治療標的となっています。

［Proteintech Group, Inc.　メーカー略号：PGI］

品名	種由来	免疫動物（クローン）	交差種	適用	サブクラス	精製	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti EPCAM/CD326	HU	Mouse（2A2D5）	HU	IF	IgG2a	Ig-PA	CL594-66316	100 µL	¥83,000	凍

■Flotillin 1

フロティリンは、2つの相同なアイソフォーム、フロティリン1（FLOT1）およびフロティリン2（FLOT2）を含む膜関連タンパク質です。フロティリンは、広範囲で発現しているタンパク質であり、脂質ラフトのマーカーとして一般的に使用されます。

［Proteintech Group, Inc.　メーカー略号：PGI］

品名	種由来	免疫動物（クローン）	交差種	適用	サブクラス	精製	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti Flotillin 1	HU	Rabbit poly	HU, MS, RT	WB, IP, IHC, IF, FC, CoIP, ELISA	IgG	Affi	15571-1-AP	150 µL	¥67,000	凍

■GOLGA2/GM130

GOLGA2は、ゴルジ膜に強く結合する表在性膜タンパク質であり、主にcis-ゴルジ膜の細胞質側面に局在します。p115、giantin、GRASP65、Rab GTPaseなどのタンパク質とともに、小胞体-ゴルジ体間輸送の制御、およびゴルジ構造の維持に関与しています。

［Proteintech Group, Inc.　メーカー略号：PGI］

品名	種由来	免疫動物（クローン）	交差種	適用	サブクラス	精製	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti GOLGA2/GM130	HU	Rabbit poly	HU, CA, MKY, HAM	WB, IHC, IF, FC, ELISA	IgG	Affi	11308-1-AP	150 µL	¥67,000	凍

■MIA

MIA（melanoma inhibitory activity）は、Melanoma-derived growth regulatory proteinやCD RAPとして知られており、悪性黒色腫のマーカーとして利用されます（PMID：9242442）。

［Proteintech Group, Inc.　メーカー略号：PGI］

品名	種由来	免疫動物（クローン）	交差種	適用	サブクラス	精製	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti MIA	HU	Rabbit poly	HU, MS, RT	IHC(p), ELISA	IgG	Affi	15734-1-AP	150 µL	¥67,000	凍

■RAB11A

Rab11タンパク質は、エンドサイトーシスおよび形質膜のリサイクリングに関与しています。Rab11aおよびRab11bはほとんどの組織で遍在的に発現しています。Rab11aは、初期エンドソームからトランスゴルジネットワークを介して、内部移行した細胞表面タンパク質および受容体のリサイクルを調節します。

※この抗体はRAB11Aに特異的であり、RAB11Bとは交差反応を示しません。

［Proteintech Group, Inc.　メーカー略号：PGI］

品名	種由来	免疫動物（クローン）	交差種	適用	サブクラス	精製	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti RAB11A-Specific	HU	Rabbit poly	HU, MS, RT, CAN	WB, IP, IHC, IF, ELISA	IgG	Affi	20229-1-AP	150 µL	¥67,000	凍

■Syntenin-1

Syntenin-1は、PDZドメインを含む分子で、多くの相互作用分子があり、膜貫通受容体輸送、細胞接着、腫瘍細胞転移、ニューロンシナプス機能を制御します。主に膜関連のアドヘレンス・ジャンクションおよび接着斑に局在している一方、小胞体および核にも存在します。

［Proteintech Group, Inc.　メーカー略号：PGI］

品名	種由来	免疫動物（クローン）	交差種	適用	サブクラス	精製	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti Syntenin-1	HU	Rabbit poly	HU, MS	WB, IP, IHC, IF, FC, ELISA	IgG	Affi	22399-1-AP	150 µL	¥67,000	凍

EV（Extracellurar Vesicles）研究用ELISAキットのご紹介

コスモ・バイオでは、エクソソームをはじめとする細胞外小胞の定量解析に使用できる ELISA キットをラインアップしています。目的にあったキットをお探しください。

		紹介ページ	捕捉分子	検出抗体	標準試薬	測定範囲（感度）
ヒト由来	CD9/CD63	74 ページ	固相化した **CD9** 抗体 （12A12）	HRP 標識 **CD63** 抗体 （8A12）	CD9/CD63 融合タンパク質	3.125 ～ 200 pg/mL （3.125 pg/mL）
	CD9/CD9	77 ページ	固相化した **CD9** 抗体	HRP 標識 **CD9** 抗体	CD9 を固定した 粒子径 200 nm のビーズ	0.281 ～ 18 ng/mL
	CD9/CD9	80 ページ	固相化した **CD9** 抗体	ビオチン標識 **CD9** 抗体	健常人ドナー 血漿／血清／尿由来 エクソソーム	リコンビナント CD9 タンパク質 39 pg ～
	CD63/CD63	77 ページ	固相化した **CD63** 抗体	HRP 標識 **CD63** 抗体	CD63 を固定した 粒子径 200 nm のビーズ	0.625 ～ 40 ng/mL
	CD63/CD9	80 ページ	固相化した **CD63** 抗体	ビオチン標識 **CD9** 抗体	COLO1 細胞株由来 エクソソーム	リコンビナント CD9 タンパク質 39 pg ～
	CD81/CD81	77 ページ	固相化した **CD81** 抗体	HRP 標識 **CD81** 抗体	CD81 を固定した 粒子径 200 nm のビーズ	7.813 ～ 250 ng/mL
	PD-L1 陽性 エクソソーム （CD9）	78 ページ	固相化した **CD9** 抗体	HRP 標識 **PD-L1** 抗体	PD-L1/CD9 融合タンパク質	0.156 ～ 10 ng/mL （0.05 ng/mL）
	EpCAM/CD9	79 ページ	固相化した **CD9** 抗体	HRP 標識 **PD-L1** 抗体	EpCAM/CD9 融合タンパク質	0.313 ～ 20 ng/mL （0.14 ng/mL）
	TUCAP-1/CD9	80 ページ	固相化した **TUCAP-1** 抗体	**CD9** 抗体 （無標識）	COLO1 細胞株由来 エクソソーム	リコンビナント CD9 タンパク質 39 pg ～
イヌ由来	CD9/CD9	81 ページ	固相化した イヌ **CD9** 抗体	HRP 標識 イヌ **CD9** 抗体	安定化させた AZ-ACU （イヌ尿路上皮がん細胞） 由来エクソソーム	3.13 ～ 200 ng/mL
	CD63/CD63	81 ページ	固相化した イヌ **CD63** 抗体	HRP 標識 イヌ **CD63** 抗体		156.25 ～ 10,000 ng/mL
グラム陽性・陰性菌、ウシ由来	グラム陽性菌由来 EV	82 ページ	負に帯電している EV を捕捉する コーティング	LTA（リポタイコ酸） 抗体 （＋ HRP 標識二次抗体使用）	乳酸菌 EV （*L. paracasei* 180913-R1 株由来）	4.00 × 10^5 ～ 1.28 × 10^7 particles/mL （4.0 × 10^5 particles/mL）
	グラム陰性菌由来 EV		負に帯電している EV を捕捉する コーティング	LPS （*Lipopolysaccharide*） 抗体 （＋ HRP 標識二次抗体使用）	大腸菌 EV （*E. coli* DH5α株由来）	8.00 × 10^6 ～ 5.12 × 10^8 particles/mL （8.0 × 10^6 particles/mL）
	ウシ由来 ミルクエクソソーム	83 ページ	固相化ウシミルク エクソソーム抗体	ビオチン標識 CD81 抗体 （＋ HRP 標識アビジン）	ミルクエクソソーム原液	1.56 ～ 100 μg/mL （1.56 μg/mL）

CD9/CD63 ELISA キット（ヒト由来エクソソーム定量用）

コスモ・バイオ株式会社

血液サンプルや細胞培養上清から直接定量

エクソソームマーカーである CD9 と CD63 に対する高性能抗体を用いたサンドイッチ ELISA により、表面に CD9 分子と CD63 分子を合わせ持つエクソソームを相対的に定量することができるキットです。標準試薬として、保存安定性に欠けるエクソソームそのものに代わり、CD9/CD63 融合タンパク質（標準タンパク質）を用いることにより安定性を確保し、再現性よく検量線を描くことができます。

特長

- ●標準試薬として保存安定性に欠けるエクソソームそのものを使用せず、CD9/CD63 融合タンパク質（標準タンパク質）を利用することで安定性と再現性を確保
- ●CD9/CD63 融合タンパク質（標準タンパク質）で補正することで各サンプルの相対定量が可能
- ●固相化した CD9 抗体（12A12）でエクソソームを捕捉し、HRP 標識した CD63 抗体（8A12）で検出

研究者が使ってみました！ Application Note あります！

ユーザーからのレポートである Application Note を 76 ページに掲載しています。

キットの原理

プレートには抗ヒト CD9 抗体が固相されていて、検体を加えると検体中のエクソソームがトラップされます。洗浄後、トラップされたエクソソーム表面の CD63 に対して HRP 標識した抗ヒト CD63 抗体を反応させ、基質を添加後 HRP による発色をプレートリーダーで読み取り定量化します。

構成内容

- ●抗 CD9 抗体固相化 96 ウェルプレート
- ●標準タンパク質
- ●アッセイバッファー
- ●洗浄バッファー
- ●HRP 標識抗 CD63 抗体
- ●基質液
- ●停止液（2N H_2SO_4）
- ●プレートシール

標準タンパク質による標準化と相対定量の概要

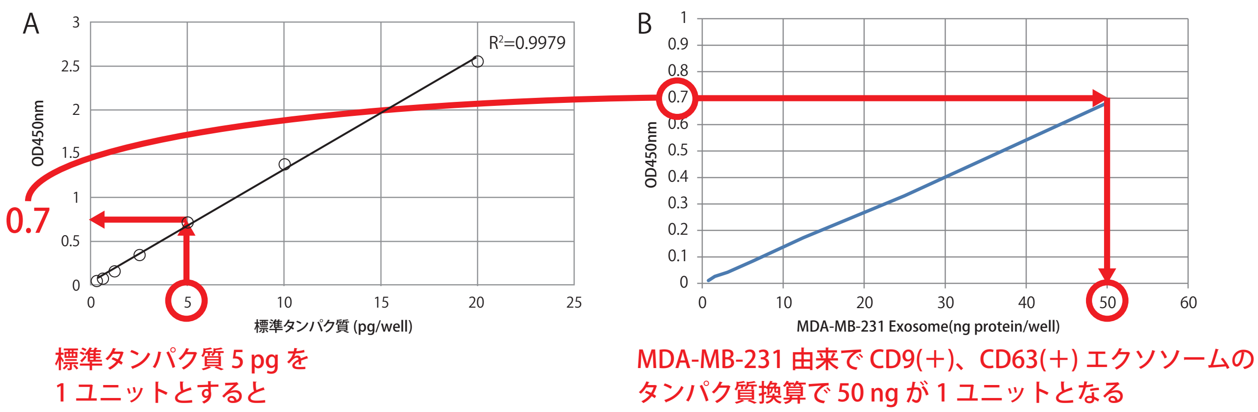


図 1　CD9/CD63 融合タンパク質による標準化と相対定量の概要
乳がん細胞株 MDA-MB-231 の培養上清から超遠心法により精製したエクソソームを 0.781、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50 ng ずつウェルに加え測定した。CD9/CD63 融合タンパク質を標準タンパク質として検量線を描き（図 1A）、例えば CD9/CD63 融合タンパク質 5 pg を 1 ユニットとした場合、その OD450 測定値は約 0.7 である。MDA-MB-231 細胞由来エクソソームの OD450 測定値をプロットした図 1B に照合すると、測定値が 0.7 に相当するのは、約 50 ng であり、これを CD9 陽性かつ CD63 陽性エクソソームとみなすことができる。

細胞培養上清サンプルの測定

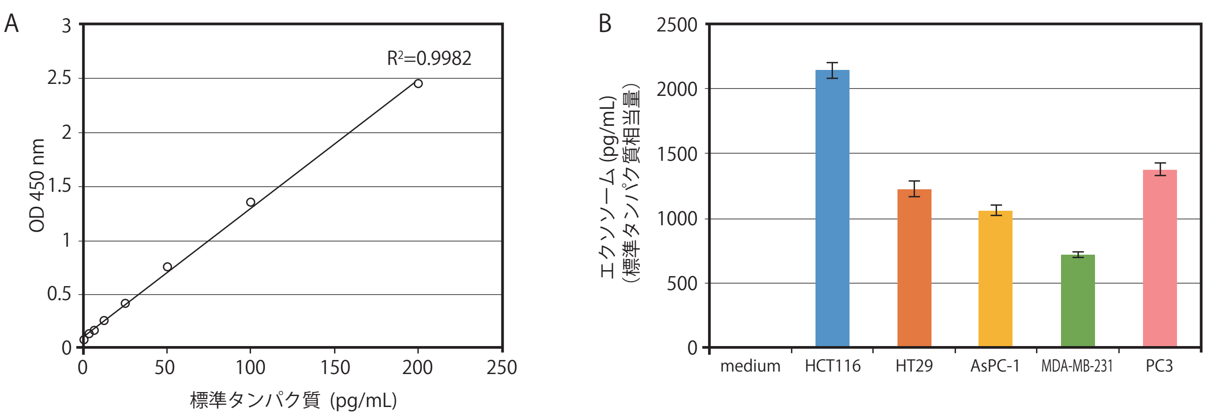
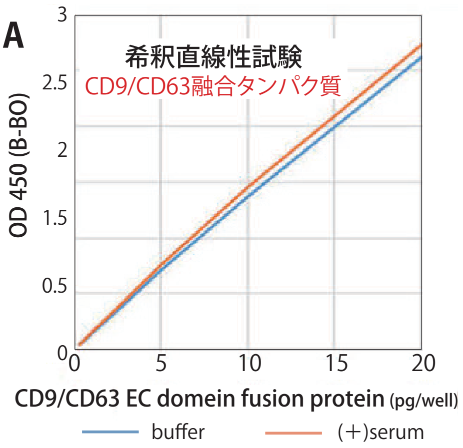


図 2　細胞培養上清サンプルの測定例
10% ウシ胎児血清（FBS）を含む培地を用いて様々な細胞株（HCT116、HT29、AsPC-1、MDA-MB-231、PC3）を 8 日間培養した後にその上清を回収し、遠心上清をサンプルとした。測定値が検量線範囲内に収まるようサンプルを適宜希釈し、希釈調製した標準タンパク質とともに測定した。
本キットでは標準タンパク質を基準とした相対定量を行う。標準タンパク質の測定結果をもとに横軸に標準タンパク質量、縦軸に吸光度を取り検量線を描く（図 2A）。この検量線とサンプルの吸光度を照らし合わせることで、サンプル中のエクソソーム量を標準タンパク質相当量として計算する（図 2B）。実験ごとに検量線を描くことで、異なる実験間のエクソソーム量を直接比較できる。

ヒト血清希釈直線性試験および添加回収試験



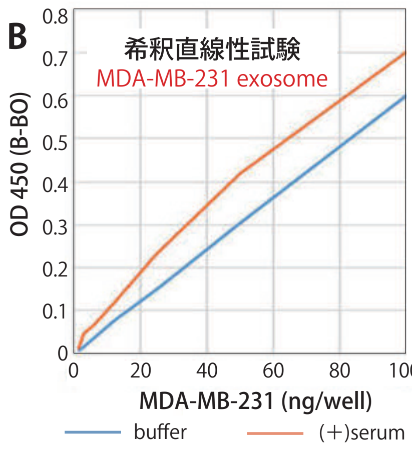
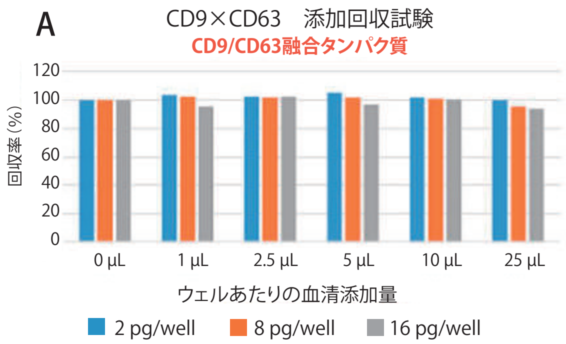


図 3　希釈直線性試験
CD9/CD63 融合タンパク質（標準タンパク質）および、MDA-MB-231 細胞由来エクソソームにヒト血清を添加し、2 倍ずつ段階希釈した場合もバッファー系の標準曲線と同様の直線性を示した。
A：CD9/CD63 融合タンパク質（標準タンパク質）添加量：20 pg、B：MDA-MB-231 細胞由来エクソソーム添加量：100 ng、ウェルあたりの血清添加量：25 µL



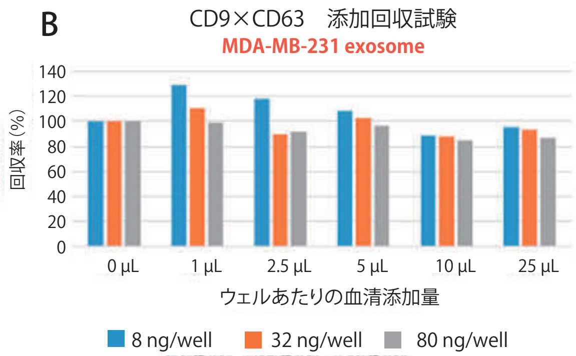


図 4　添加回収試験
ウェルあたりの血清添加量：1、2.5、5、10、25 µL A：ウェルあたりの CD9/CD63 融合タンパク質（標準タンパク質）添加量：2、8、16 pg、B：ウェルあたりの MDA-MB-231 細胞由来エクソソーム添加量：8、32、80 ng
CD9/CD63 融合タンパク質（標準タンパク質）では、1 ウェルあたり 25 µL の血清存在下においても 100% 前後の添加回収率を示し、MDA-MB-231 細胞由来エクソソームにおいてもバラつきが生じたものの概ね CD9/CD63 融合タンパク質（標準タンパク質）に準ずる結果が得られた。

［コスモ・バイオ株式会社　メーカー略号：CSR］

品名	測定範囲	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CD9/CD63 Exosome ELISA Kit	3.125 ～ 200 pg/mL	EXH0102EL	1 kit（96 tests）	¥100,000	冷

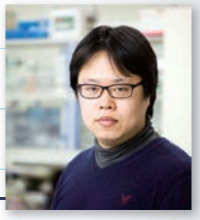
研究者が使ってみました！

Application Note

あぷりけーしょんのーと

CD9 / CD63 ELISA キットによるがん細胞由来エクソソームの定量

ユーザーレポート
小坂 展慶　Nobuyoshi Kosaka
国立がん研究センター研究所　分子細胞治療研究分野
東京医科大学産学連携講座細胞外小胞創薬研究講座



Products

- CD9/CD63 Exosome ELISA Kit
  品番：EXH0102EL　メーカー：コスモ・バイオ株式会社　メーカー略号：CSR

　最近、様々な研究分野で注目を浴びるエクソソームは、脂質の二重膜をもつ直径約 100 nm ほどの細胞外に分泌される小胞である。エクソソームの定義として、エンドソーム由来の顆粒とされているが、その産生・分泌機構に関しては不明な点が多い。エクソソーム研究が盛んになるにつれ、様々な疾患におけるエクソソームの機能が明らかにされているが、今後のさらなる研究の進展やエクソソームを標的とした疾患治療法の開発には、エクソソームの産生機構を充分に理解する必要がある。

　エクソソームの産生機構の理解には、エクソソームの定量が必須であるが、これまでのエクソソームの定量法は、超遠心によりエクソソームを単離した後に、タンパク質定量や NTA 法（Nanoparticle Tracking Analysis 法）などにより粒子数の測定をする方法が一般的であった。しかしこれらの方法では、エクソソームの産生機構に関わる遺伝子のスクリーニングには不向きであり、精製なしにエクソソームを高感度に定量できる方法が必須である。

　エクソソームの定量方法として様々なものが販売されているが、今回は簡便性と実用性を考えて、普段の研究でも使用している ELISA 法を用いることとし、コスモ・バイオ社から発売している CD9 / CD63 ELISA キットを使用した。

　図に示した細胞数で前立腺がん細胞株 PC-3M 細胞を 96 ウェルプレートに播種した翌日、培養液を無血清培地に変え、2 日間培養した。その後培養上清を回収し、「遠心などの精製行程」をしないで本キットによる定量を行った。図に示すように、培養上清中のエクソソーム量を定量することに成功した。さらにその量は、細胞の播種数に依存して増えることがわかった。興味深いことに、H_2O_2 で処理して細胞死を起こした PC-3M 細胞の培養上清では、一切のシグナルが検出されなかった。

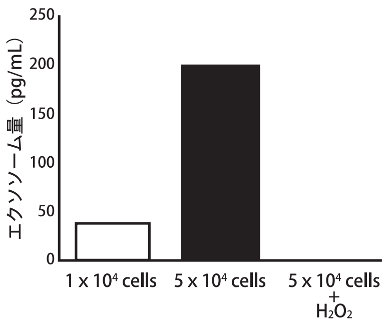


図　それぞれの PC-3M 細胞数と H_2O_2 処理後の培養上清における エクソソームの定量

本 ELISA キットは、細胞死により生じた細胞断片でも偽陽性を示さなかったことから非常にエクソソームに特異性の高い ELISA キットであると言える。今後、エクソソームの産生機構を解明することを目的とした様々なスクリーニングに貢献すると思われる。

詳しい情報は、74 ページへ

敬称は省略させていただきます

ヒト由来エクソソームを直接定量する ELISA キット（CD9/CD9、CD63/CD63、CD81/CD81）

Hakarel

エクソソームの定量法としては、エクソソームが含むタンパク質量で代替したり、ナノトラッキング法による粒子解析がありますが、これらの方法は超遠心法などで一旦エクソソームを精製する必要があります。体液中や細胞培養液中のエクソソームを直接定量する手段は極めて限られており、これまで一般的な方法は開発されてきませんでした。

本キットは、エクソソーム・マーカーである CD9、CD63 や CD81 それぞれに対する高性能抗体を用いたサンドイッチ ELISA により、表面に CD9、CD63 や CD81 分子を持つエクソソームを相対的に定量することができます。

特長

- 標準試薬として保存安定性に欠けるエクソソームそのものを使用せず、CD9、CD63 や CD81 を固定した粒子径 200 nm のビーズを使用して安定性と再現性を確保
- **エクソソーム構造を模した CD9 あるいは CD63 あるいは CD81 スタンダードビーズにより補正**することで、各サンプルの相対定量が可能
- 固相化した CD9、CD63 あるいは CD81 抗体でエクソソームを捕捉し、HRP 標識した CD9、CD63 あるいは CD81 抗体で検出

構成内容

- 抗 CD9＊1 抗体固相化 96 ウェルプレート（8 well × 12 strips）1 枚
- CD9＊1 スタンダードビーズ＊2
- アッセイバッファー
- 洗浄バッファー（10 ×）
- HRP 標識抗 CD9＊1 抗体（500 ×）
- 基質液
- 停止液（2N H_2SO_4）
- プレートシール　2 枚

＊1　品番：HAK-HEL6363-1 は、CD63　品番：HAK-HEL8181-1 は、CD81
＊2　n=2 として、検量線 4 回分

測定値の標準化

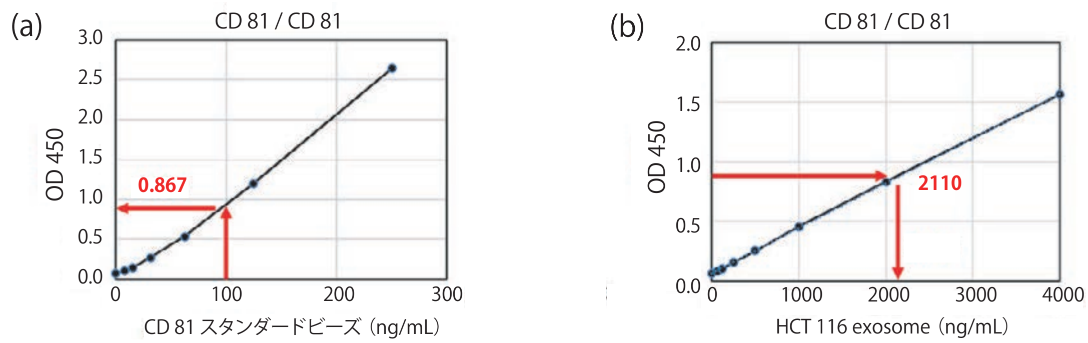


図 1　測定値の標準化の例（CD81 スタンダードビーズによる標準化と相対定量の概要）
CD81 スタンダードの測定結果から得られたグラフを検量線とし、例えば 100 ng/mL を 1 U/mL とした場合、その OD450 測定値は約 0.867 になっています（図 1（a））。サンプルである HCT116 細胞由来エクソソームの OD450 測定値が 0.867 に相当するのは図 1（b）よりエクソソーム約 2,110 ng/mL のタンパク質換算量に相当します。すなわち、HCT116 細胞由来エクソソーム約 2,110 ng/mL を 1 U/mL の CD81 陽性エクソソームとみなすことができます。このようにして、異なるサンプル間、あるいは異なる実験間のエクソソーム測定値をすべてユニットで示すことにより標準化して測定値を補正することができ、検体中のエクソソーム量を直接比較することが可能となります。

測定例

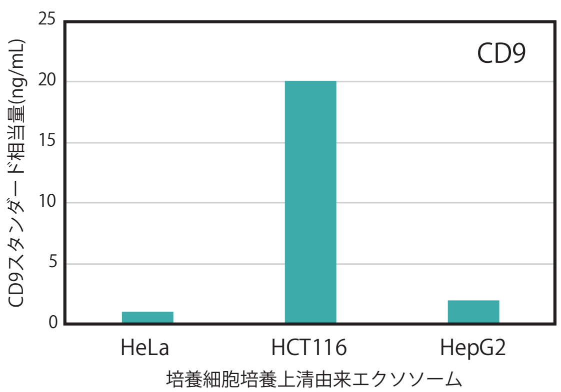


図 2　CD9/CD9 ELISA による精製エクソソームの定量

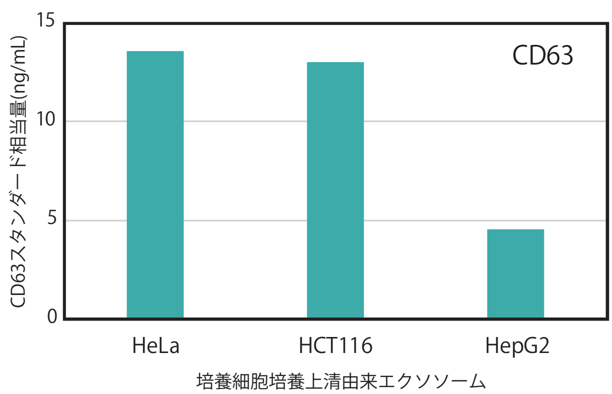


図 3　CD63/CD63 ELISA による精製エクソソームの定量

3 種類のヒトがん細胞株（HeLa、HCT116、HepG2）の培養上清（無血清）から超遠心法で精製したエクソソームを 500 ng/mL の濃度に希釈し、それぞれ CD9/CD9 ELISA（図 2）あるいは CD63/CD63 ELISA（図 3）で測定した。定量値は CD9（あるいは CD63）タンパク質を固定したスタンダードビーズによる標準曲線にあてはめてそれぞれのスタンダードビーズ相当量（ng/mL）で示した。その結果、細胞種によって表面の CD9、CD63 の相対量に特長があることがわかった。

［株式会社ハカレル　　メーカー略号：HAK］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ヒト由来エクソソーム定量用 CD9 / CD9 ELISA キット	HAK-HEL0909-1	1 kit（96 tests）	¥100,000	冷
ヒト由来エクソソーム定量用 CD63 / CD63 ELISA キット	HAK-HEL6363-1	1 kit（96 tests）	¥100,000	冷
ヒト由来エクソソーム定量用 CD81 / CD81 ELISA キット	HAK-HEL8181-1	1 kit（96 tests）	¥100,000	冷

PD-L1 陽性エクソソーム（CD9）ELISA キット

Hakarel

PD-L1 陽性エクソソームを 1Step ELISA 法で直接定量！

エクソソーム・マーカーである CD9 と免疫チェックポイント関連分子である PD-L1 に対する高性能な抗体を利用し、ヒトの血液や細胞培養液において細胞が分泌するエクソソームの表面に発現する PD-L1 分子を検出するサンドイッチ ELISA キットです。

特長

- ●ヒト PD-L1 陽性エクソソームを ELISA 法で高感度に検出（検出感度：0.05 ng/mL ＊）
- ●ヒト血液サンプルや細胞培養上清などに含まれる PD-L1 陽性エクソソームを直接定量可能
- ●特殊な装置は不要で、通常のプレートリーダーがあれば測定可能
- ●標準試薬として保存安定性に欠けるエクソソームそのものを使用せず、PD-L1/CD9 融合タンパク質（標準タンパク質）を利用することで安定性と再現性を確保
- ●PD-L1/CD9 融合タンパク質（標準タンパク質）を用いた標準曲線で読み取ることで各サンプルの相対定量が可能

＊ ブランク吸光度の標準偏差と検量線の傾きから算出 [1]

構成内容

- ●抗 CD9 抗体固相化プレート（8-well × 12 strips）
- ●標準タンパク質（PD-L1/CD9 融合タンパク質）
- ●アッセイバッファー
- ●洗浄バッファー（10 ×）
- ●HRP 標識抗 PD-L1 抗体（500 ×）
- ●基質液
- ●停止液（2N H_2SO_4）
- ●プレートシール

交差性	Human
サンプルタイプ	血清、血漿、細胞培養上清
測定範囲	0.156 ～ 10 ng/mL
感度	0.05 ng/mL

表　仕様

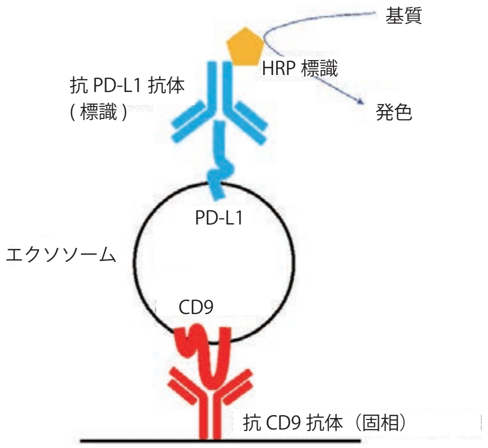


図 1　測定原理図

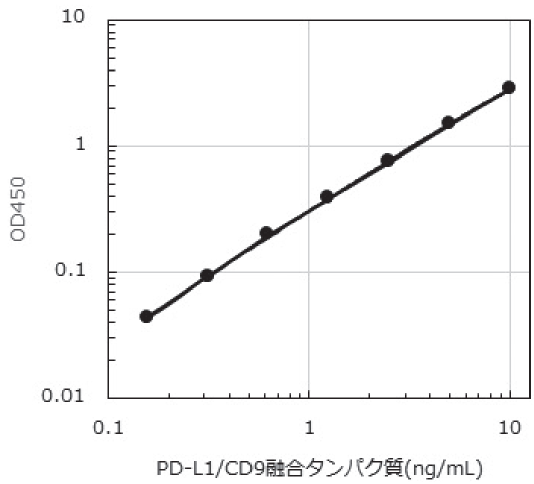


図 2　標準曲線

背景

現在、臨床治験に組み入れられた PD-L1 IHC 検査（免疫組織化学染色法）が、がん組織・細胞中の PD-L1 発現率の測定を目的として開発が進められコンパニオン診断薬として利用されています。一般的に IHC 検査は、侵襲性が高く被験者の負担も大きいことから、その負担を軽減できるエクソソームを利用したリキッドバイオプシーの研究も進んでいます。

エクソソームにも PD-L1 が発現し、がん細胞表面の PD-L1 と同じトポロジーをとり、細胞外ドメインがエクソソームの表面に露出し、濃度依存的に T 細胞の PD-1 に結合します [2]。また、転移性メラノーマ患者と健常者の血中循環エクソソームの比較において、転移性メラノーマ患者の PD-L1 レベルが有意に高いと示唆されています [2]。

参考文献

1) 厚生労働省、厚生省医薬安全局審査管理課長通知、医薬審、第 338 号、平成 9 年 10 月 28 日.
2) Gang Chen, Alexander C. Huang, Wei Zhang, *et al*. *Nature*, 560, pages382–386 (2018)

［株式会社ハカレル　　メーカー略号：HAK］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ヒト PD-L1 陽性エクソソーム（CD9）ELISA キット	HAK-HELPDL109-1	1 kit（96 tests）	¥100,000	冷

EpCAM/CD9 エクソソーム ELISA キット

Hakarel

血液サンプルや細胞培養上清から EpCAM 陽性エクソソームを ELISA 法で直接定量

エクソソーム・マーカーである CD9 と上皮組織由来のがんの診断および予後のマーカーと言われる EpCAM に対する高性能なモノクローナル抗体を利用し、ヒトの血液や細胞培養液において細胞が分泌する EpCAM 陽性エクソソームを直接定量的に検出する 2 ステップサンドイッチ ELISA キットです。

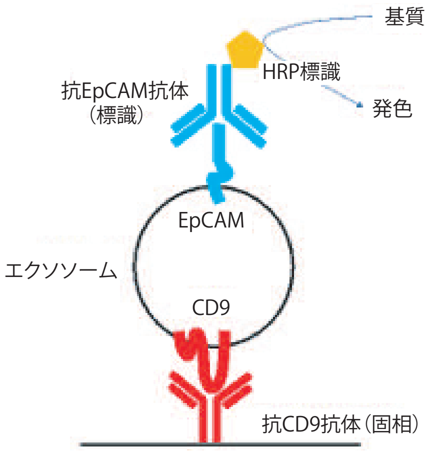


図 1

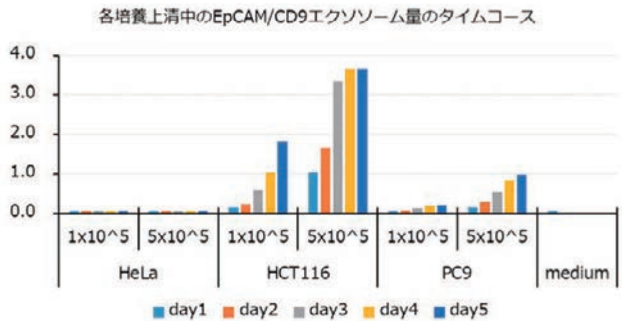


図 2　EpCAM/CD9 Exosome ELISA Kit, Human 使用例

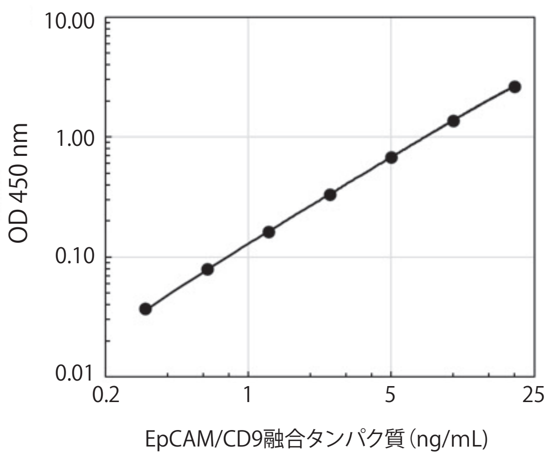


図 3　標準曲線

特長

- ●ヒト血液サンプルや細胞培養上清などに含まれる EpCAM 陽性エクソソームを直接定量可能
- ●特殊な装置は不要で、通常のプレートリーダーがあれば測定可能
- ●標準試薬として保存安定性に欠けるエクソソームそのものを使用せず、EpCAM/CD9 融合タンパク質（標準タンパク質）を利用することで安定性と再現性を確保
- ●EpCAM/CD9 融合タンパク質（標準タンパク質）を用いた標準曲線で読み取ることで各サンプルの相対定量が可能

構成内容

- ●抗 CD9 抗体固相化プレート 96 well（8-well × 12 strips）
- ●標準タンパク質（EpCAM/CD9 融合タンパク質）
- ●アッセイバッファー
- ●洗浄バッファー（10 ×）
- ●HRP 標識抗 PD-L1 抗体（500 ×）
- ●基質液 12 mL
- ●停止液（2N H_2SO_4）
- ●プレートシール

交差性	Human
サンプルタイプ	血清、血漿、細胞培養上清
測定範囲	0.313 ～ 20 ng/mL
感度 [1]	0.14 ng/mL

表　仕様

ヒト EpCAM（上皮細胞接着因子）とは

ヒト EpCAM（上皮細胞接着因子：epithelial cell adhesion molecule）は、細胞膜表面に存在する 314 アミノ酸からなる膜貫通型糖タンパク質です。多くのがん組織では EpCAM が過剰発現し、特に、結腸、直腸、乳房、肺、前立腺がんで EpCAM の発現亢進が観察されます [2]。EpCAM は、細胞間接着に関与するだけでなく、細胞増殖やがん幹細胞性など、腫瘍の進行に関連する他の重要な細胞機能にも影響を与えます [3]。

参考文献

1) 厚生労働省、厚生省医薬安全局審査管理課長通知、医薬審、第 338 号、平成 9 年 10 月 28 日.
2) PT. Went, A. Lugli, S. Meier, *et al.*: *Hum Pathol.*, 35, 122 (2004).
3) K. Laura, W. Stefan, P. Klaus: *Cell Stress.*, 3, 165 (2019).

［株式会社ハカレル　メーカー略号：HAK］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
EpCAM/CD9 Exosome ELISA Kit, Human	HAK-HELEPCAM09-1	1 kit（96 tests）	¥100,000	㊅

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/cf-RNA 精製
その他
受託サービス

ExoTEST™ Ready-to-Use ELISA キット

Hansa BioMed

エクソソームを ELISA 法で定量

トライアルサイズあります

ExoTEST™ Ready-to-Use キットは、ヒト臨床検体（血漿、血清、尿、唾液）／細胞培養上清からの、エクソソームのイムノキャプチャー・定量・特性解析にご使用いただける ELISA キットです。

特長

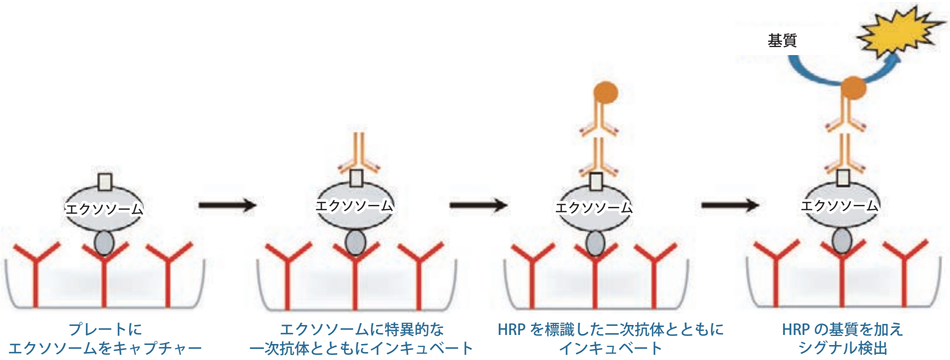
- ●Ready-to-Use
- ●アッセイの前にエクソソームを精製する必要はありません
- ●複数のマーカーの解析に適しています
- ●トライアルキットをご用意（3 ELISA ストリップ、24 ウェル分）
- ●ヒト血漿用：サンプルとしてそのまま使用可、サンプル量 100 µL

アプリケーション

- ●ヒト生体液や細胞培養上清からのエクソソームの捕捉と定量
- ●エクソソームの網羅的なプロファイリング
- ●病態（炎症、がん、神経変性など）の検出およびモニタリングに利用できる非侵襲的バイオマーカーの前臨床研究

構成内容

イムノプレート	エクソソーム特異的なキャプチャー抗体（α-CD9 マウス抗体）でプレコート済み 96 ウェル（12 ストリップ× 8 ウェル）
エクソソームスタンダード	検量線用のエクソソームスタンダード（凍結乾燥品）
エクソソームマーカー検出用抗体	エクソソーム検出用 一次抗体：抗ヒト CD9 抗体、二次抗体：HRP 標識
バッファー	サンプルバッファー：抗体希釈・インキュベート用 洗浄バッファー：ELISA プレート洗浄用
試薬	シグナル検出用試薬



使用例

エクソソームを少量から高感度に検出、低いバックグラウンドでの定量が可能

ExoTEST™ の感度をウエスタンブロットと比較した。ExoTEST™ は、ウエスタンブロットよりも感度が高く、凍結乾燥エクソソーム 10 µg は、エクソソーム組換えタンパク質 0.1 ng と同等であった（図 1、2）。スタンダードカーブの最小値は凍結乾燥エクソソーム 0.39 µg であることから（図 1）、本商品の感度は同等のタンパク質約 39 pg となる。また、エクソソームのキャプチャーに使用するイムノプレートは、バックグラウンドが低いことが示された（図 1）。

ExoTEST™ による検出

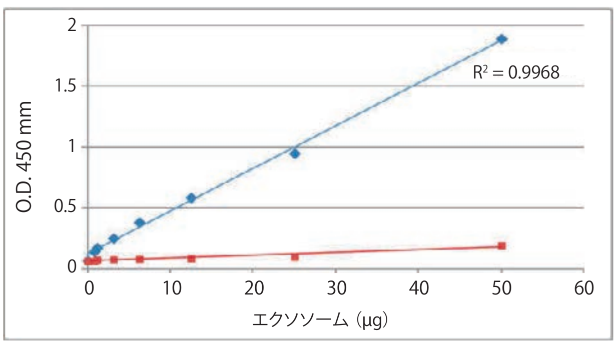


図 1　健常ドナーの血漿由来エクソソームスタンダード（品番：HBM-PEP100、35 ページ参照）を用いた CD9 の検出（青色）
観察されたバックグラウンド（二次抗体のみ）を赤色で示す。

同じサンプルをウエスタンブロットで検出した場合

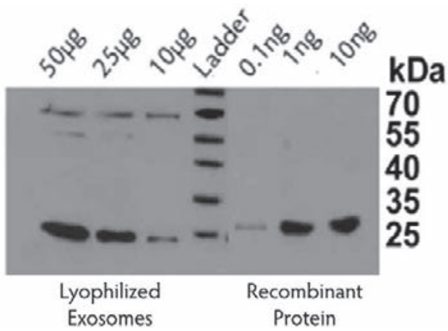


図 2　ヒト血漿由来エクソソーム（凍結乾燥品、品番：HBM-PEP100、35 ページ参照）と CD9 組換えタンパク質を用いた、エクソソームマーカーである CD9 をウエスタンブロットによる検出

ExoTEST™ ー 全エクソソームのイムノキャプチャー・定量用

［HansaBioMed OU　　メーカー略号：HNB］

品名	検出方法	検出抗体	スタンダード	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ヒト血清用							
ExoTEST™ for Overall Exosome capture and quantification from human SERUM	CD9/CD9	a-CD9 (Mouse)	ヒト血清（健常）由来エクソソーム	HBM-RTK-POS/TS	1 kit (96 wells)	¥207,000	冷
ヒト血漿用							
ExoTEST™ for Overall Exosome capture and quantification from human plasma	CD9/CD9	a-CD9 (Mouse)	ヒト血漿（健常）由来エクソソーム	HBM-RTK-POF/TP	1 kit (96 wells)	¥207,000	冷
ヒト尿用							
ExoTEST™ for Overall Exosome capture and quantification from human urine	CD9/CD9	a-CD9 (Mouse)	ヒト尿（健常）由来エクソソーム	HBM-RTK-POF/TU	1 kit (96 wells)	¥207,000	冷
細胞培養上清用							
ExoTEST™ for Overall Exosome capture and quantification from cell culture supernatant	CD63/CD9	a-CD9 (Mouse)	COLO-1 細胞上清由来エクソソーム	HBM-RTK-POC/TC	1 kit (96 wells)	¥207,000	冷

ExoTEST™ ー ヒト腫瘍由来エクソソームの濃縮・定量用

［HansaBioMed OU　　メーカー略号：HNB］

品名	検出方法	検出抗体	スタンダード	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ExoTEST™ for Tumor-derived Exosome enrichment and quantification from biological fluid	TUCAP-1/CD9	a-CD9 (Murine)	COLO-1 細胞上清由来エクソソーム	HBM-RTK-PTF/TC	1 kit (96 wells)	¥207,000	冷

ELISA ▶▶▶ ELISA

記事 ID 検索 ▶▶▶ 43198

イヌ由来エクソソームの ELISA キット（CD9/CD9、CD63/CD63）

Hakarel

エクソソームの構造上の特徴の一つとして表面上に存在するテトラスパニンファミリーが挙げられます。イヌにおいても CD9 や CD63 はそのメンバー分子で、エクソソームの表面マーカーとして存在しています[1) 2)]。本キットは、エクソソーム・マーカーであるイヌ CD9、CD63 に対する高性能抗体を用いた 2 ステップサンドイッチ ELISA により、表面にイヌ CD9、CD63 分子を持つエクソソームを相対的に定量することができます。（固相化したイヌ CD9、CD63 抗体でエクソソームを捕捉し、HRP 標識したイヌ CD9、CD63 抗体で検出。）

特長

- ●血液サンプルや細胞培養上清などに含まれるエクソソームを直接定量
- ●通常のプレートリーダーで測定（波長 450 nm）。
- ●標準試薬として安定化させた AZ-ACU（イヌ尿路上皮がん細胞）由来エクソソームを使用
- ●エクソソームスタンダードにより補正することで各サンプルの相対定量が可能

参考文献

1) E. J. Fish, K. J. Irizarry, P. DeInnocentes, *et al*.: *BMC Cancer*., 18, 832 (2018).
2) M. A. Rojas, B. B. Rentzsch, J. Plendl, *et. al*.: *BMC Vet Res*., 14, 179 (2018).

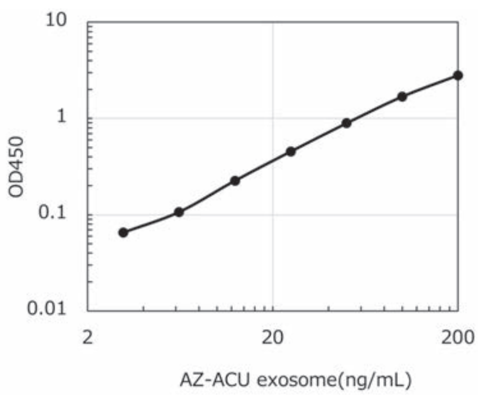


図 1　CD9/CD9 ELISA による標準曲線
各標準タンパク質濃度の吸光度からブランク吸光度を差し引いた値をプロットしています。

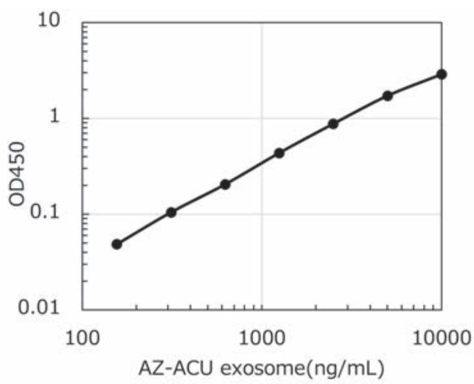


図 2　CD63/CD63 ELISA による標準曲線
各標準タンパク質濃度の吸光度からブランク吸光度を差し引いた値をプロットしています。

［株式会社ハカレル　　メーカー略号：HAK］

品名／構成内容	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
イヌ由来エクソソーム定量用 CD9/CD9 ELISA キット	HAK-DEL0909-1	1 kit（96 tests）	¥100,000	冷
イヌ由来エクソソーム定量用 CD63/CD63 ELISA キット	HAK-DEL6363-1	1 kit（96 tests）	¥100,000	冷

【共通構成内容】 ●抗イヌ CD9＊1 抗体固相化 96 ウェルプレート（8-well × 12 strips）　●エクソソームスタンダード　4 本＊2　●アッセイバッファー　●洗浄バッファー（10 ×）　● HRP 標識抗イヌ CD9＊1 抗体（500 ×）　●基質液　●停止液（2N H_2SO_4）　●プレートシール

＊ 1　品番：HAK-DEL6363-1 は、CD63　＊ 2　n=2 として、検量線 4 回分

Bacterial EV ELISA Kit

コスモ・バイオ株式会社

ELISA で手軽にバクテリア由来の Extracellular vesicle（EV）を定量

マーカータンパク質の同定が進んでいないが、本キットなら定量できる！

EV 表面が負に帯電していることを利用してプレート表面に EV を捕捉します。グラム陽性菌由来 EV には anti-LTA（リポタイコ酸）抗体、グラム陰性菌由来 EV には anti-LPS（Lipopolysaccharide）抗体を用いることで、高額な装置なしに微生物由来 EV の相対定量が可能です。

特長

●通常の ELISA 法と同様の操作で微生物由来 EV の相対定量が可能
●標品が付属、すぐに実験を始められる
●高感度で少量のサンプルで測定可能

構成内容

●EV 検出プレート
●EV 標準液（乳酸菌 EV または大腸菌 EV）
●アッセイバッファー
●洗浄バッファー（10 ×）
●一次抗体（100 ×）（抗 LTA 抗体または抗 LPS 抗体）
●HRP 標識二次抗体（200 ×）
●基質液
●停止液（2N H_2SO_4）
●プレートシール

背景

細胞外小胞（extracellular vesicle ： EV）は細胞から放出される脂質二重膜を持つ粒子の総称で、細胞間の情報伝達に重要な役割を果たすとされ、盛んに研究されています。

多細胞生物の EV 定量においてはマーカータンパク質に対する抗体を用いた ELISA キットが多く開発されていますが、微生物の場合はマーカータンパク質の同定が進んでいないことからナノトラッキング解析による定量が主流であり、高額な装置が必要となっています。

検出限界

●グラム陽性菌由来 EV　4.0 × 10^5 particles/mL
●グラム陰性菌由来 EV　8.0 × 10^6 particles/mL

※溶媒に高濃度の塩を含む場合プレートに捕捉できない可能性があります。塩濃度が 150 mM 以下になるようリン酸バッファーなどで溶媒置換もしくは希釈してご使用ください。

検量線測定例

Gram-positive bacterial EV ELISA Kit および Gram-negative bacterial EV ELISA Kit の検量線測定例を示しました。

大腸菌 EV 標準液については、370 倍量のヒトミルクエクソソームを添加（大腸菌 EV 5.12 × 10^8 に対してヒトミルクエクソソーム 1.9 × 10^{11} を添加）した場合も測定し、ターゲット以外の EV が大量に存在する場合でも定量性に影響しないことを確認しました。

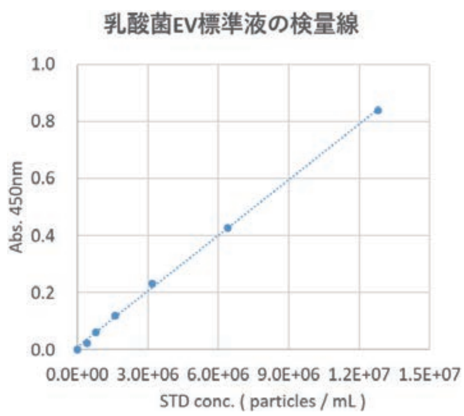


図 1

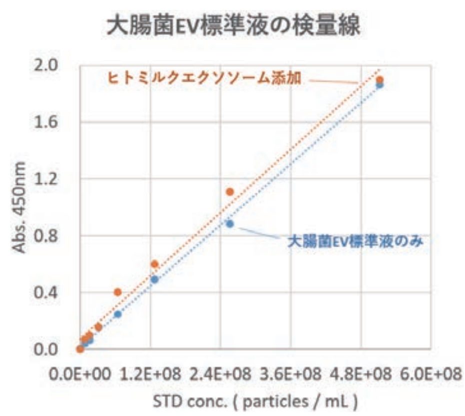


図 2

[コスモ・バイオ株式会社　　メーカー略号：CSR]

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
グラム陽性菌由来 EV 定量用 ELISA キット	EVEL01	1 kit（96 tests）	¥70,000	㊎
グラム陰性菌由来 EV 定量用 ELISA キット	EVEL02	1 kit（96 tests）	¥70,000	㊎

■関連商品

[コスモ・バイオ株式会社　　メーカー略号：CSR]

品名	Web の記事 ID	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
乳酸菌由来細胞外小胞（Lactobacillus paracasei 180913-R1 株）	38209	LBEV-R2	200 μL（> 1 × 10^{10} particles/mL）	¥50,000	㊎
大腸菌由来細胞外小胞（DH5 α）	38209	ECEV	200 μL（> 1 × 10^{10} particles/mL）	¥50,000	㊎
ヒト由来エクソソーム定量用 CD9 × CD63 ELISA キット	33510	EXH0102EL	1 kit（96 tests）	¥100,000	㊎
ウシ由来ミルクエクソソーム ELISA キット	33311	EXBMEL	1 kit（96 tests）	¥93,000	㊎

ウシ由来ミルクエクソソーム ELISA キット

コスモ・バイオ株式会社

超遠心による精製は不要！ CD81 を検出

抗ミルクエクソソーム抗体をキャプチャー抗体とし、エクソソームマーカーの 1 つである抗 CD81 モノクローナル抗体を検出用抗体としたサンドイッチ ELISA キットです。

健康な牛から採取された生乳から超遠心分離法により調製したエクソソーム画分を標準エクソソームとして、ウシミルクやウシ血清といった検体中のエクソソームを定量することができます。

特長

- ●ウシミルク、ウシ血清などに含まれるエクソソームを直接定量
- ●特殊な装置は不要、通常のプレートリーダーで測定可能
- ●超遠心精製法により分画したウシ由来ミルクエクソソームを標準品として添付

構成内容

- ●固相化抗体（× 100）
- ●固相化抗体希釈液
- ●96 well プレート、8-well × 12 strips
- ●プレートシール（3 枚）
- ●アッセイバッファー、50 mL
- ●洗浄液（× 10）
- ●ミルクエクソソーム標準液（450 µg/mL）
- ●ビオチン化・抗 CD81 抗体（× 100）
- ●HRP 標識アビジン（× 100）
- ●発色基質溶液
- ●反応停止液

背景

ヒト、ウシ、ラットなどの広範な動物の乳中にもエクソソームが存在し、miRNA や mRNA、タンパク質などを内包し、標的細胞へ取り込まれることによってそれらが機能することが示唆されています [1)]。

さらに最近の研究では、前述のようなエクソソームの性質を利用して、ドラッグデリバリー担体（DDS）としての研究もおこなわれており、とくに、生乳由来のエクソソームは、抗がん剤の経口投与手段としても注目されています [2)]。

参考文献

1) Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages, Hirohisa Izumi, *et al.*, *J Dairy Sci*. 2015 May; 98(5): 2920-33
2) Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel, Ashish K.Agrawal *et al.*, *Nanomedicine*. 2017 Jul; 13(5): 1627-1636.

測定例

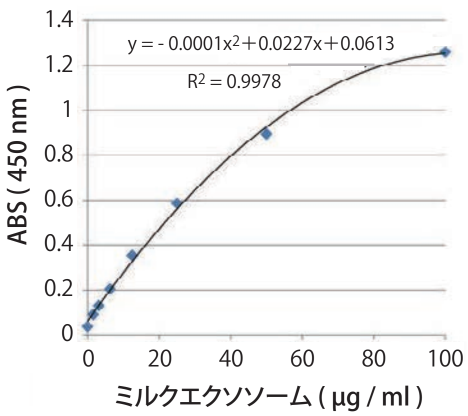


図 1　標準曲線の例

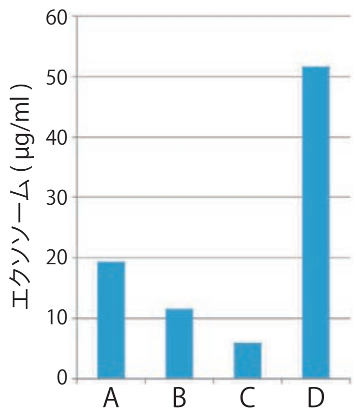


図 2　ウシミルク中のエクソソームの測定例
ウシミルク間でエクソソーム含量に違いがあることがわかった。

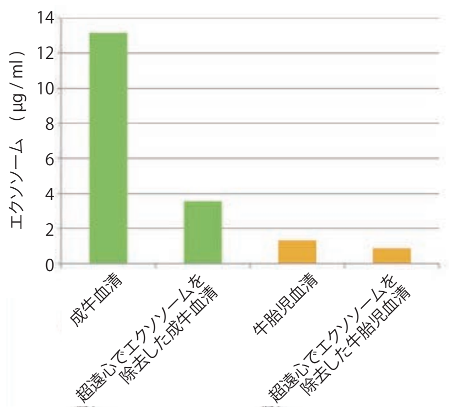


図 3　ウシ血清中のエクソソームの測定例
エクソソーム濃度は成牛血清濃度が高く、超遠心でエクソソームを除去すると低くなった。これに比べ牛胎児血清はエクソソーム含量が低いことがわかった。

［コスモ・バイオ株式会社　　メーカー略号：CSR］

品名	測定範囲	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ウシ由来ミルクエクソソーム ELISA キット	1.56 ～ 100 µg/mL	EXBMEL	1 kit（96 tests）	¥93,000	冷

FC/FCCS ▸▸▸ フローサイトメトリー　WEB 記事 ID 検索 ▸▸▸ 33529

ExoStep™ エクソソーム フローサイトメトリー解析キット

immunostep

エクソソームを簡単に定量解析、immunophenotyping にも

本商品は、ビーズ結合抗 CD63 捕捉抗体および蛍光色素結合抗 CD9 検出抗体・抗 CD81 抗体を使用して、フローサイトメトリーでエクソソームを検出／定量できる簡単な免疫ビーズアッセイです。再現性のある結果を提供し、エクソソームの immunophenotyping と平行して実施することができます。

特長

●特異性が高い正確なエクソソーム検出
●定量分析、蛍光とエクソソーム量の優れた相関性
●細胞培養上清および生体液中からのエクソソームを直接検出*
●少量のサンプルから検出可能
●高感度、広いダイナミックレンジ
●捕捉したエクソソーム集団を同時に immunophenotyping

＊ 直接検出のプロトコールは、コスモ・バイオの Web 記事ID 33529 検索 に掲載しています。

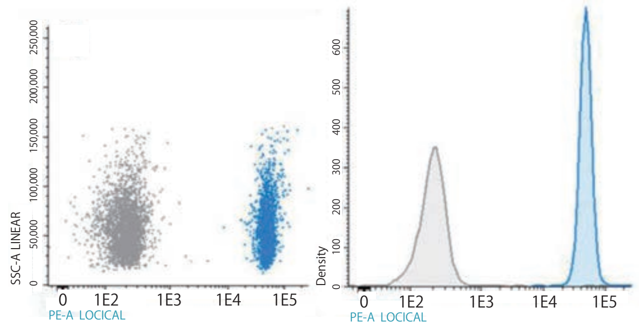


図 1　ExoStep™ を使用したエクソソームのフローサイトメトリー解析
PC3 細胞培養上清より精製・濃縮したエクソソームを PBS に再懸濁し、CD63 捕捉用ビーズと混合して一晩室温でインキュベートした。翌日、ビーズ結合エクソソームを一次検出抗体（CD9 ビオチン／CD81 ビオチン）およびストレプトアビジン -PE で間接的に染色し、フローサイトメトリー解析を行った。

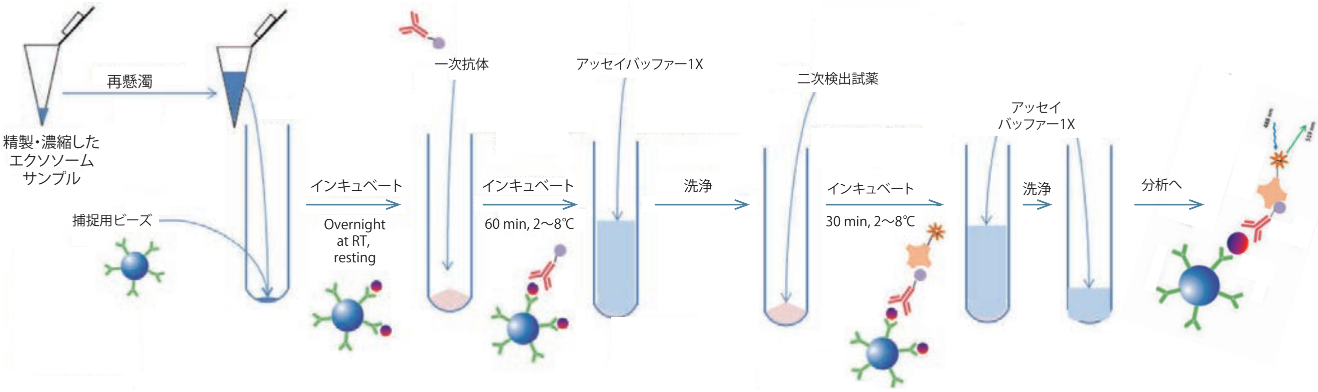


図 2　免疫ビーズアッセイによるエクソソームの immunophenotyping 手順
超遠心などで精製・濃縮したエクソソームを CD63 捕捉用ビーズと混合し、室温でオーバーナイト、インキュベートする。ここへ一次検出抗体（CD9 ビオチン／ CD81 ビオチン）を結合し、アッセイバッファーで洗浄したあと、二次検出試薬として PE 標識ストレプトアビジンを加え、インキュベーションおよび洗浄後フローサイトメトリーにより解析します。

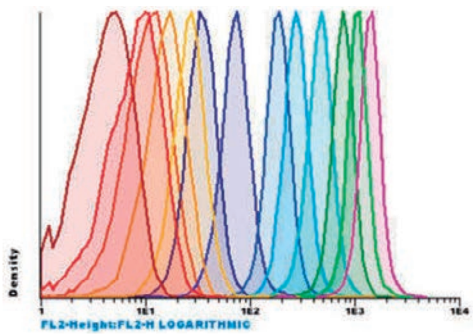


図 3　ExoStep™ ダイナミックレンジ
ExoStep™ のダイナミックレンジ（0 ～ 128 µg）を示すフローサイトメトリーヒストグラム
サンプル：PC3 細胞株由来エクソソーム

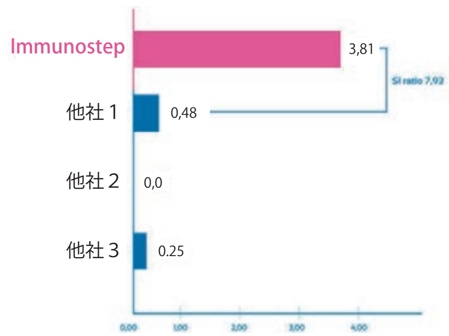


図 4　競合他社間の感度比較

構成内容

●**ExoStep™ Cell Culture（品番：EXOS-25-C9）**
・CD63+（クローン：TEA3/18）捕捉ビーズ
（直径 6.5 ± 0.2 µm（CV ＜ 5%）のポリスチレン微粒子、6,000 beads/test）
・Anti-CD9 PE（クローン：VJ1/20）
・アッセイバッファー

●**ExoStep™ Plasma（品番：EXOS-25-P9）**
・CD9 捕捉ビーズ
（平均直径 6.5 ± 0.2 µm（CV ＜ 5%）のポリスチレン微粒子、6,000 beads/test）
・Anti-CD81 PE（クローン：M38）
・アッセイバッファー

●**ExoStep™ Urine（品番：EXOS-25-U9）**
・CD63+（クローン：TEA3/18）捕捉ビーズ
（平均直径 6.5 ± 0.2 µm（CV ＜ 5%）のポリスチレン微粒子、3,000 beads/test）
・Anti-CD9 PE（クローン：VJ1/20）
・アッセイバッファー

［IMMUNOSTEP, S.L.　メーカー略号：ISP］

用途	品名	検出抗体	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ヒト培養細胞からのエクソソーム用	ExoStep™ Cell Culture	CD9	EXOS-25-C9	25 tests	￥149,000	冷
ヒト血漿からのエクソソーム用	ExoStep™ Plasma	CD9	EXOS-25-P9	25 tests	￥147,000	冷
ヒト尿からのエクソソーム用	ExoStep™ Urine	CD9	EXOS-25-U9	25 tests	￥149,000	冷

■関連商品

［IMMUNOSTEP, S.L.　メーカー略号：ISP］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Lyophilized Exosome Standards	EXOPC3	100 μg	￥76,000	冷
Human CD9 Capture Beads for Flow Detection	9CB-25	25 tests	￥78,000	冷
Human CD63 Capture Beads for Flow Detection	63CB-25	25 tests	￥78,000	冷
Human CD81 Capture Beads for Flow Detection	81CB-25	25 tests	￥82,000	冷
Human CD326 (EpCAM) Capture Beads for Flow Detection	326CB-25	25 tests	￥82,000	冷
IgG1 Capture Beads for Flow Detection (Negative control)	IGG1CB-25	25 tests	￥70,000	冷

■関連商品　フローサイトメトリーにおすすめな抗体

［IMMUNOSTEP, S.L.　メーカー略号：ISP］

品名	免疫動物（クローン）	種由来	標識	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti CD9	Mouse（VJ1/20）	Human	Biotin	9BEXO-25	25 tests	￥29,000	冷
			CF™ Blue	9CFEXO-25	25 tests	￥30,000	冷
			FITC	9FEXO-25	25 tests	￥37,000	冷
			PE	9PEEXO-25	25 tests	￥41,000	冷
Anti CD63	Mouse（TEA3/18）	Human	Biotin	63BEXO-25	25 tests	￥29,000	冷
			CF™ Blue	63CFEXO-25	25 tests	￥41,000	冷
			FITC	63FEXO-25	25 tests	￥30,000	冷
			PE	63PEEXO-25	25 tests	￥37,000	冷
Anti CD81	Mouse（M38）	Human	Biotin	81BEXO-25	25 tests	￥50,000	冷
			CF™ Blue	81CFEXO-25	25 tests	￥54,000	冷
			FITC	81FEXO-25	25 tests	￥62,000	冷
			PE	81PEEXO-25	25 tests	￥70,000	冷
Anti CD326	Mouse（VU-1D9）	Human	Biotin	326BEXO-25	25 tests	￥50,000	冷
			FITC	326FEXO-25	25 tests	￥54,000	冷
			PE	326PEEXO-25	25 tests	￥62,000	冷

FC/FCCS ▸▸▸ フローサイトメトリー　　WEB 記事 ID 検索 ▸▸▸ 42908

ExoBrite™ EV Membrane Staining Kits

Biotium

エクソソームをフローサイトメトリーにより低バックグラウンドで検出

ExoBrite™ 色素は、従来の色素で課題とされていたエクソソームや EV（細胞外小胞）サイズの色素の凝集体を形成しないため、染色されたエクソソームを低バックグラウンドで正確に識別することができます。色素はエクソソーム膜の分子に結合し、フローサイトメトリーによって分離した EV を高感度かつ特異的に検出します。

また、ポリスチレンビーズへの非特異結合をしないため、ビーズに結合したエクソソーム染色にも使用可能です。

その他にも、CF® 色素標識抗体などの抗体染色と組み合わせてマルチパラメーター分析も可能です。

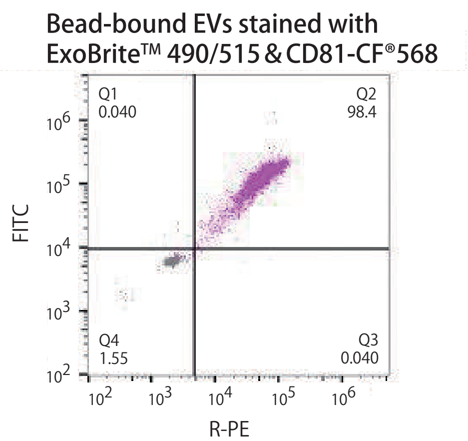


図 1　MCF-7 細胞に由来するビーズ結合エクソソームのフローサイトメトリー

特長

- ●EV とエクソソームの膜を染色
- ●精製されたエクソソームとビーズに結合したエクソソームの両方を染色
- ●鮮やかなシグナルと低いバックグラウンド
- ●フローサイトメトリーによる検出に最適
- ●抗体との共染色が可能

背景

フローサイトメトリーでは、エクソソームは細胞破片やその他の小さな粒子と区別するのが難しい場合があり、そのサイズは一部のフローサイトメーターの検出限界以下となります。特定の色素または抗体で染色するとエクソソームを他の粒子と区別するのに役立ちますが、これらの小さな粒子自体が染色されたエクソソームと混同される可能性があるため、低バックグラウンドの蛍光色素を使用することが重要です。

分析前に EV を濃縮または精製するために使用される方法も重要な要素です。単純な PEG 沈殿ステップで濃縮されたサンプルには、多くの場合、膜染色色素にも結合する可能性のある非 EV 脂質粒子が大量に含まれています。抗テトラスパニン抗体に結合した磁気ビーズを使用することで、純粋なエクソソームを得ることができます。（ただし、これらのビーズは、膜染色色素などの多くの疎水性色素と非特異的に結合する可能性があります。）

次のページへ続く

ExoBrite™ EV Membrane 染色キットで染色された精製エクソソーム

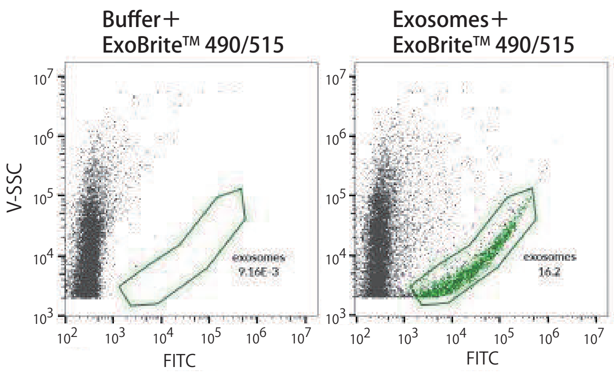


図 2　SEC で精製した MCF-7 由来のエクソソームを ExoBrite™ 490/515 EV Membrane 染色キットで染色した（右）。バッファー中の同じ染色と比較して、特異的な染色が見られた（左）。エクソソームは、FITC チャネルの CytoFLEXLX フローサイトメーターで検出した。

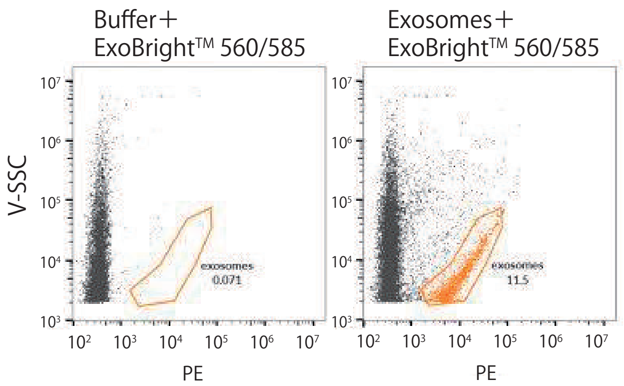


図 3　SEC で精製した MCF-7 由来のエクソソームを ExoBrite™ 560/585 EV Membrane 染色キットで染色した（右）。バッファー中の同じ染色と比較して、特異的な染色が見られた（左）。エクソソームは、PE チャネルの CytoFLEXLX フローサイトメーターで検出された。

ExoBrite™ EV Membrane 染色／抗体共染色

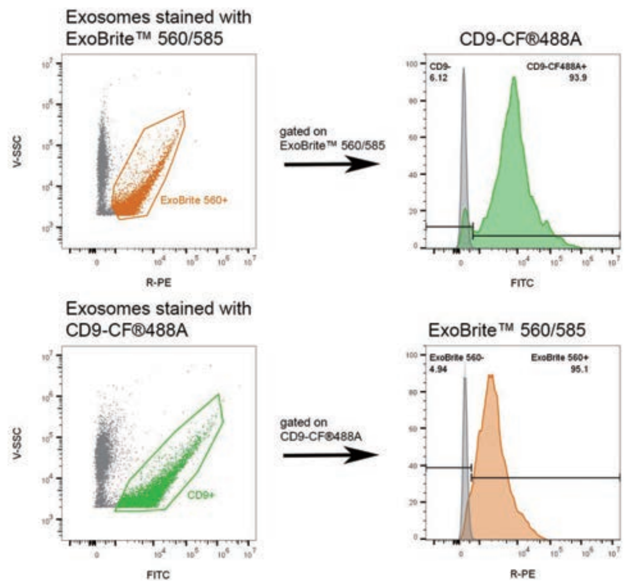


図 4　SEC 精製した MCF-7 由来のエクソソームを 1 mL の 10x ExoBrite™ 560/585 EV 膜染色色素と 0.1 µg/mL CD9(H19a)-CF® 488A を同時に用いて染色した。ExoBrite™ 560/585 陽性粒子をゲートにかけた場合、～95% が CD9 に対して陽性を示した（上段）。同様に、CD9 陽性粒子をゲートにかけると、～95% が ExoBrite™ 560/585 に対しても陽性であった（下段）。

ExoBrite™ EV Membrane 染色キットで染色されたビーズ結合 EV

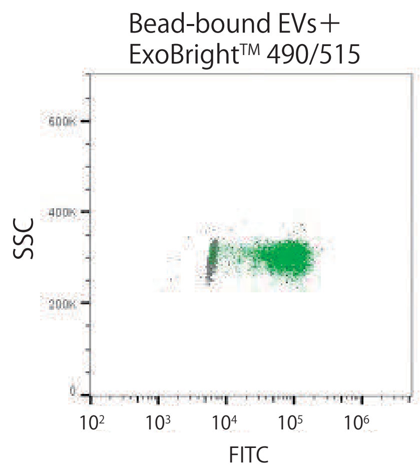


図 5　MCF-7 細胞に由来するビーズ結合エクソソームのフローサイトメトリー。未染色のエクソソーム（灰色）または 10XExoBrite™ 490/515（緑色）で染色。エクソソームは、FITC チャネルの CytoFLEXLX フローサイトメーターで検出した。

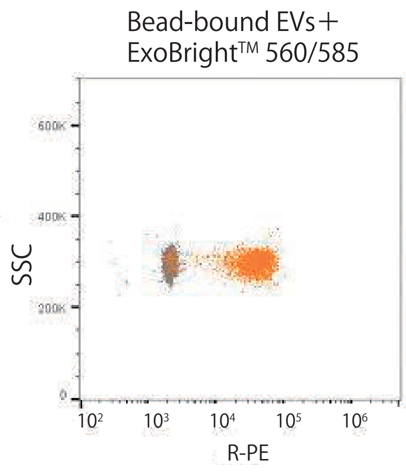


図 6　MCF-7 細胞に由来するビーズ結合エクソソームのフローサイトメトリー。未染色のエクソソーム（灰色）または 10XExoBrite™ 560/585（オレンジ）で染色。エクソソームは、R-PE チャネルの CytoFLEXLX フローサイトメーターで検出した。

[Biotium, Inc.　　メーカー略号：BTI]

品名／構成内容	Ex/Em（nm）	チャネル	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ExoBrite™ 490/515 EV Membrane Staining Kit	490/516	FITC	30112-T	1 kit（100 Labelings）	¥47,000	冷
			30112	1 kit（500 Labelings）	¥162,000	冷
ExoBrite™ 560/585 EV Membrane Staining Kit	562/584	PE, Cy® 3	30113-T	1 kit（100 Labelings）	¥47,000	冷
			30113	1 kit（500 Labelings）	¥162,000	冷
ExoBrite™ 410/450 EV Membrane Staining Kit	416/452	Pacific Blue™	30111-T	1 kit（100 Labelings）	¥47,000	冷
			30111	1 kit（500 Labelings）	¥162,000	冷
ExoBrite™ 640/660 EV Membrane Staining Kit	642/663	APC	30114-T	1 kit（100 Labelings）	¥47,000	冷
			30114	1 kit（500 Labelings）	¥162,000	冷

【共通構成内容】　●ExoBrite™ EV Membrane Stain　●ExoBrite™ Reconstitution Solution

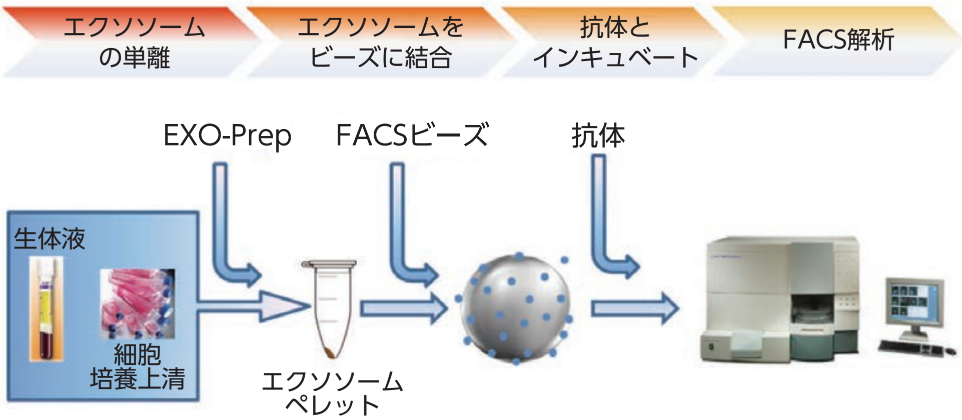
Exo-FACS Ready-to-Use キット

Hansa BioMed

エクソソームマーカーを FACS 解析

生体液や細胞培養上清からエクソソームを単離し、FACS を用いてエクソソームマーカーを解析するためのキットです。本キットには、EXO-Prep 試薬（エクソソームの単離用）、4 μm ビーズ（単離したエクソソームを全体的にキャプチャー）、細胞培養上清／ヒト生体液由来のエクソソーム（凍結乾燥品、ポジティブコントロール）が含まれます。エクソソームに含まれるタンパク質（膜発現または内部）の解析は、適切な検出抗体を用いて行います。

ヒト生体液（血漿／尿／血清／唾液）および細胞培養上清用のキットをご用意してます。



特長

- ●Ready-to-Use
- ●アッセイの前にエクソソームを精製する必要なし
- ●ポジティブコントロールとしてエクソソームスタンダード（凍結乾燥品）入り
- ●複数のマーカーの解析に適しています

アプリケーション

- ●エクソソームの単離および FACS によるエクソソームマーカーの解析
- ●エクソソームの網羅的なプロファイリング

構成内容

- ●EXO-Prep（49 ページ参照）（エクソソームの単離用）
- ●FACS ビーズ
- ●エクソソームスタンダード（凍結乾燥品、ポジティブコントロール）
- ●一次抗体（ポジティブコントロールとしてエクソソームマーカーを検出、CD9 or CD63）
- ●二次抗体（Alexa® 488 標識）
- ●サンプルバッファー（抗体のインキュベート用）

使用例

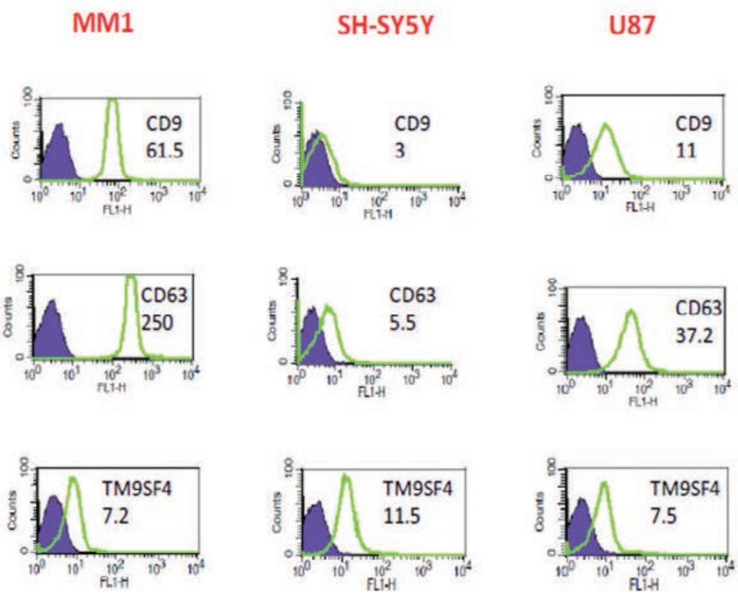


図　MM1 細胞、SH-SY5Y 細胞、U87 細胞から精製したエクソソームに含まれるエクソソームマーカー（CD9、CD63、TM9SF4）の FACS 解析

Exo-FACS は、様々なサンプルに由来するエクソソームのタンパク質マーカーの解析にご使用いただけます。エクソソームとビーズを 4℃で一晩インキュベートして結合させます。その後、特定のエクソソームマーカーに対する蛍光標識抗体で標識します。メラノーマ（MM1）、神経芽細胞腫（SH）、神経膠芽腫（U87）の細胞培養上清から精製したエクソソームに含まれる、3 種類のエクソソームマーカーの発現プロファイルを図に示します。

次のページへ続く

■血清、血漿、尿用（検出抗体：抗ヒト CD9）

[HansaBioMed OU　　メーカー略号：HNB]

品名	検出抗体	サンプル	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Exo-FACS kit for analysis of SERUM exosomes	抗ヒト CD9	血清	HBM-FACS-PES	1 kit	¥107,000	冷
Exo-FACS kit for analysis of PLASMA exosomes	抗ヒト CD9	血漿	HBM-FACS-PEP	1 kit	¥107,000	冷
Exo-FACS kit for analysis of URINE exosomes	抗ヒト CD9	尿	HBM-FACS-PEU	1 kit	¥137,000	冷

■細胞培養上清用

検出抗体：抗ヒト CD63
下記リストより、ご希望の細胞由来の「エクソソームスタンダード」をお選びいただけます。

- ●COLO1 細胞株（ヒト大腸がん）
- ●MM1 細胞株（ヒトメラノーマ）
- ●BLCL21 細胞株（EBV で形質転換した B リンパ芽球様細胞）
- ●U87 MG 細胞株（ヒト神経膠芽腫／星状細胞腫）
- ●SK-N-SH 細胞株（ヒト神経芽細胞腫）
- ●HCT116 細胞株（ヒト大腸がん）
- ●PC3 細胞株（ヒト前立腺腺がん　グレード IV）
- ●BPH-1 細胞株（ヒト前立腺肥大症）
- ●DAUDI 細胞株（ヒトバーキットリンパ腫）
- ●A549 細胞株（肺がん）
- ●K-562 細胞株（慢性骨髄性白血病（胸水））
- ●マウス B16F10 細胞株（マウスメラノーマ）

[HansaBioMed OU　　メーカー略号：HNB]

品名	検出抗体	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Exo-FACS ready to use kit for analysis of exosomes markers from cell lines on request	抗ヒト CD63	HBM-FACS-C	1 kit	¥137,000	冷

■MSC（間葉系幹細胞）用

検出抗体：抗ヒト CD63

[HansaBioMed OU　　メーカー略号：HNB]

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Exo-FACS ready to use kit for analysis of exosomes markers from cell media (MSC exosomes)	HBM-FACS-MSC	1 kit	¥160,000	冷

SMART FCCS

コスモ・バイオ株式会社

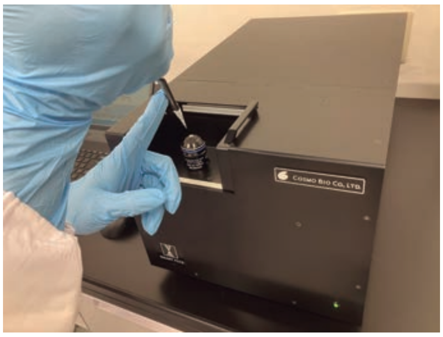
コンパクトで簡単　蛍光相関分光法（FCS）／蛍光相互相関分光法（FCCS）

『SMART FCCS』は、蛍光相関分光法（FCS、Fluorescence Correlation Spectroscopy）または蛍光相互相関分光法（FCCS、Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy）という手法による解析を従来機や従来法に比べ簡便に実施できる装置で、蛍光染色試薬や蛍光標識抗体で標識した微粒子の濃度や大きさなどを測定できます。

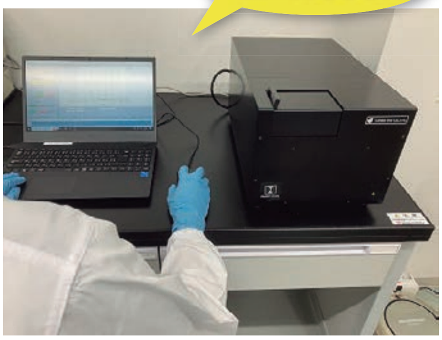
従来、FCS 解析や FCCS 解析を行うためには、共焦点蛍光顕微鏡やフォトンカウンティングのための検出器、相関器とソフトウェアを組み合わせた、大型で非常に煩雑な操作を伴う装置が必要でした。本製品は、**卓上のコンパクトなサイズ**となっており、特許技術である蛍光相関分光装置[※1]を光学系に搭載することで、従来の装置と比較して小型化および煩雑な作業をなくすことができ、さらに解析ソフトウェア[※2]と高性能相関器とを一体化することにより、測定後すぐに結果を得ることができる解析機器となっています。

※ 1　国立大学法人北海道大学が保有する特許技術（特許第 6667868 号）
※ 2　国立研究開発法人産業技術総合研究所で開発

SMART FCCS



コンパクトサイズ

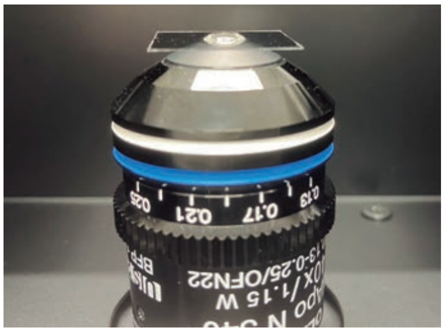


特長

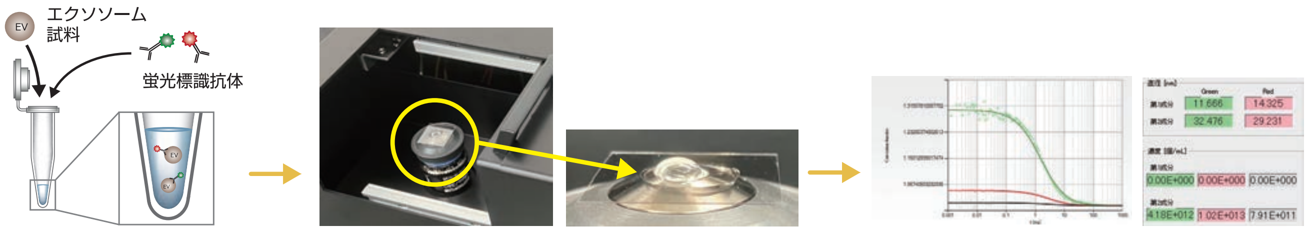
- ●1 ～ 200 nm の径の蛍光粒子を測定可能
- ●2 波長のレーザーを装備（Ex. 488, 633 nm）
- ●単色測定（FCS）、二色測定（FCCS）の両モードを搭載し、簡便に測定可能
- ●コスモ・バイオ各種エクソソーム抗体を使用して、FCS/FCCS によるエクソソームの定量解析が可能
- ●膨大な演算はハードで行い、結果がリアルタイムに得られる
- ●本体はコンパクトで軽量
- ●本体価格だけでなく、ランニングコストが安い

使用目的

FCS 解析や FCCS 解析は、通常は分子間相互作用の解析などに使われますが、その原理を近年話題の細胞外小胞のひとつであるエクソソームの検出や凝集タンパク質の検出などに応用したものが本製品です。2 色の蛍光を使い分けることができるため、これらのマーカーに対する抗体に蛍光標識を付しておきエクソソームに結合させ、それらを検出することができます。



測定手順

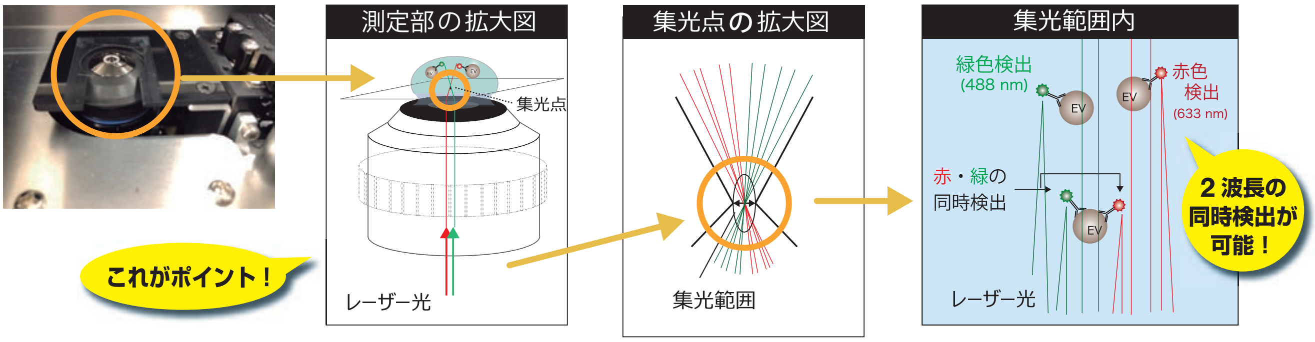


① 試料調製　→　② 装置セット　→　③ 測定・結果表示

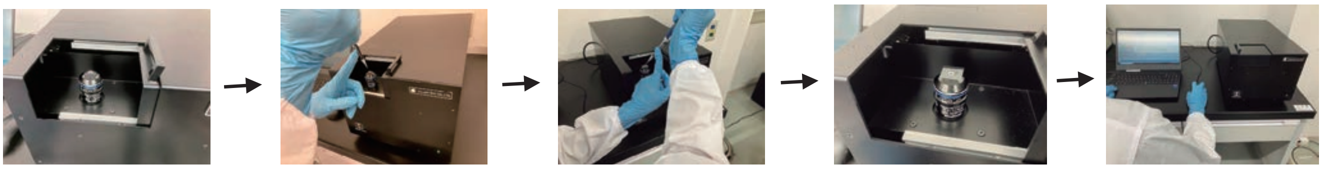
次のページへ続く

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/cf-RNA 精製
その他
受託サービス

測定原理



ポイント①　　操作方法は簡便



❶ サンプル扉を開け、対物レンズ上に超純水を置く

❷ カバーガラスを 1 枚乗せる

❸ バックグラウンド測定を行う

❹ Fluorescein（他の標準物質でも良い）をカバーガラス上かつレンズの上になる位置に 20 µL 以上乗せる

❺ 測定する（測定手順はソフト説明参照）

❻ 測定終了後、カバーガラスごと廃棄（廃棄方法は実験施設規則に従う）

❼ 対物レンズ上の超純水が少なければ補充し、カバーガラスを 1 枚乗せる

❽ 測定したい試料をカバーガラス上かつレンズの上になる位置に 20 µL 以上乗せる

❾ 測定する

❿ 測定終了後、カバーガラスごと廃棄

⓫ 手順 7 ～ 10 を繰り返し、測定を行う

測定時間は数十秒～数分（ユーザーが設定、デフォルト設定は 30 秒× 5 回）
測定終了後すぐに結果表示、測定データは自動保存機能でオートセーブ

ポイント②　　膨大な演算はハードで行い、結果がリアルタイムに得られる

FCS、FCCS 測定で得られた膨大なデータ収集と演算を、本体と一体となっている相関器がリアルタイムに行い、接続する PC ソフトで粒子濃度、粒子径の結果まで自動で得るシステムとなっている。膨大な数の演算は本体内蔵の相関器が行うため、接続用 PC には計算負荷がかからない設計である。

●従来の測定

共焦点レーザー顕微鏡をベースとした測定系でデータを収集
↓
収集されたデータを別途購入する相関器、または高性能な解析用 PC で相関関数の演算
↓
解析ソフトを入れた PC でモデル式フィッティング、粒子濃度、粒子径の計算結果を得る

●本製品（SMART FCCS）の測定

SMART FCCS 本体で測定、本体内部の相関器が自己／相互相関演算を行い、接続した PC のソフトでフィッティング、粒子濃度、粒子径の測定までが自動で行われ、PC に結果が示される。


相関器

ポイント③　　本体価格だけでなく、ランニングコストが安い

使用する消耗品は基本的にカバーガラスのみ。

測定時に必要な道具

●マイクロピペット（100、20、10 µL 用）およびチップ
●カバーガラス（No.1 規格、厚さ 0.13 ～ 0.17 µm のもの）
●サンプル用エッペンチューブ

測定時に必要な材料

●超純水（滅菌不要）
●レンズペーパー
●PBS など検体希釈用の溶液

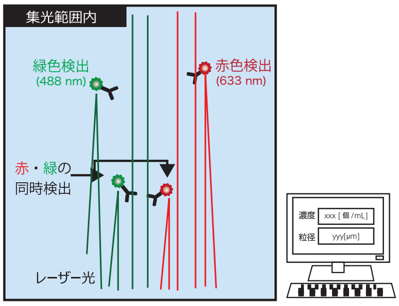
蛍光色素標識抗体を用いたエクソソーム検出・定量解析例

SMART FCCS による HCT116 細胞培養上清由来エクソソームを検出した。

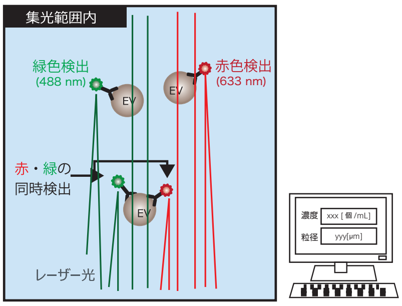
❶ 蛍光標識抗体の測定・演算

使用抗体
Anti CD63:Tide Fluor™ 2WS 標識
品番：SHI-EXO-M02-TF2

Anti CD9:Tide Fluor™ 5 標識
品番：SHI-EXO-M01-TF5



❷ 蛍光標識抗体を結合させたエクソソームの測定・演算



❸ 測定結果例

第 1 成分 =　第 2 成分 =

a. 抗体の粒子直径
b. 抗体が結合した粒子の直径
c. a で検出した粒子の濃度
d. b で検出した粒子の濃度
e. 2 つの抗体が同時に結合している粒子の濃度

仕様

本体仕様

製品サイズ	高さ 230 mm ×幅 300 mm ×奥行 520 mm
重量	約 8 kg
電源	AC100 V、60 W

解析仕様　マルチプルタウ方式ハードウェア相関器搭載

入力	2 チャネル
自己相関	2 チャネル（緑、赤各 1 チャネル）
相互相関	1 チャネル
最小サンプリング時間および自己相関関数時間分解能	640 ns

光学仕様

励起波長（緑）	488 ± 10 nm
励起出力（緑）	10 mW 以上（光源出射端において）
検出用フィルター（緑）	ET535/50m（CHROMA）
検出器（緑）	PMT（浜松ホトニクス H10682-210）
励起波長（赤）	633 ± 10 nm
励起出力（赤）	10 mW 以上（光源出射端において）
検出用フィルター（赤）	ET665LP-TRF（CHROMA）
検出器（赤）	PMT（浜松ホトニクス H10682-01）
蛍光分光用フィルター	T570lpxr（CHROMA）
対物レンズ※	20 倍（オリンパス UAPON20XW340）or 40 倍（オリンパス UAPON40XW340）
コリメーター※	20 mm（Thorlabs C20APC-A）or 40 mm（Thorlabs C40APC-A）

※対物レンズとコリメーターは選択式で、仕様によって本体価格が変更になります。

コリメーター、対物レンズ	参考価格
20 mm コリメーター、40 倍対物レンズ	665 万円
20 mm コリメーター、20 倍対物レンズ	650 万円
40 mm コリメーター、40 倍対物レンズ	670 万円
40 mm コリメーター、20 倍対物レンズ	655 万円

20 mm コリメーター：測定領域が広い、集光能力はやや劣る。
40 mm コリメーター：測定体積が狭く、集光能力が高い。FCS としての性能は高い。

［コスモ・バイオ株式会社　メーカー略号：PMC］

品名	品番	包装	貯蔵
SMART FCCS SYSTEM	FCCS01	1 set	室

ご選択いただいたコリメーター、対物レンズの種類により価格が変動いたします。

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/ cf-RNA 精製
その他
受託サービス

総説 FCSとFCCS　その特徴と今後の展開へ向けて

— エクソソーム研究にも利用可能なFCSとFCCS —

北海道大学　大学院先端生命科学研究院

金城　政孝 先生

1. はじめに

蛍光相関分光法（Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS）の基本的な概念は1970年代に提案され、それから90年代後半の共焦点光学系を利用した実用化と共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡との融合や、GFPなどの蛍光タンパク質の利用による細胞生物分野への利用拡張など、現在までに様々な改良が行われ、すでに目新しい方法ではない。しかし、*in vitro* から *in vivo* まで同じ測定プラットホームを利用でき、従って、溶液モデル系やエクソソーム同定などから実際の生細胞内の分子間相互作用の検出までシームレスに研究を展開可能である。また単一生細胞内での分子間相互作用を分析する手法として認知・確立されている。さらにFCSの発展的手法である、2種類の、つまり2色の蛍光色素を利用する蛍光相互相関分光法（Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy、FCCS）では、測定条件や測定装置の光軸調整などにも細心の注意が必要であるものの、細胞内分子間相互作用を直接検出し、その解離定数（*Kd*）を決定可能なことが大きな特徴である。

ここではこれらFCSやFCCSの基礎や原理について簡単に述べるとともに、今度の発展について述べてみたい。FCS/FCCSの詳細な解説や実際の測定など利用法[1) 2)]、また発展的手法については他を参考にして欲しい[3) 4)]。

2. 蛍光相関分光法

蛍光相関分光法の測定原理は、通常の共焦点レーザー顕微鏡の焦点領域に相当する極微小領域での観測を基本としている（図1A）。溶液中や細胞内の分子はブラウン運動というランダムな拡散運動をしているため（図1B）この極微小な焦点領域ではこのブラウン運動により、絶えず出入りする蛍光分子により蛍光強度揺らぎを引き起こす（図1C）。FCS測定はそのような揺らぎの変化の自己相関関数を求め、その変化から<u>分子の動きを反映する</u>**「拡散定数」**を得る方法である（図1D）。また、もう一つの特徴として、蛍光強度の揺らぎの大きさから<u>**観察領域に存在する「分子数」**</u>を同時に知ることも可能である。また焦点領域の大きさ（容量）を利用すると**「蛍光分子の濃度」**を得ることが可能となる。

3. 蛍光相互相関分光法

蛍光相互相関分光法（Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy, FCCS）は分子間相互作用分析に重点をおいた測定方法である。FCCSは2種類の蛍光色素の蛍光強度変化の同時性測定から、<u>2種類の分子の**「時間的・空間的同時性」**、すなわち**「相互作用」**を直接求める方法である</u>。

FCCSの厳密な原理と詳細な説明に関しては、他の文献等[1)]を参考にしていただき、ここでは図2を利用して直感的な原理の説明を述べる。

相互作用をする生体分子を用意し各々2種類の蛍光色素を標識をし、それぞれ青色蛍光と赤色蛍光とする。青色又は赤色に蛍光標識された分子が結合または同一の複合体に含まれている場合、2種類の蛍光色素は観察領域に同時に出入りし（図2A）、青色蛍光と赤色蛍光の強度変化は同時に検出される確率が高くなる（図2B）。この同時性の強さを表したのが相互相関関数であり、同時性の確率が高いと相互相関の振幅は大きくなる（図2C）。反対に、2種類の蛍光標識分子が相互作用しないときは、それぞれの蛍光色素がランダムに観察領域に入るために（図2D）各々の蛍光強度変化と（図2E）蛍光自己相関関数は得られるが、一方で、2つのシグナルが同時に検出される可能性は低く、従って、相互相関関数は小さくなる（図2F）。

このようにFCCSは2種類の分子間の相互作用や複合体形成や小胞内やその表面に2種類の分子が共存することの有無を簡単に見分ける手法として利用可能である。

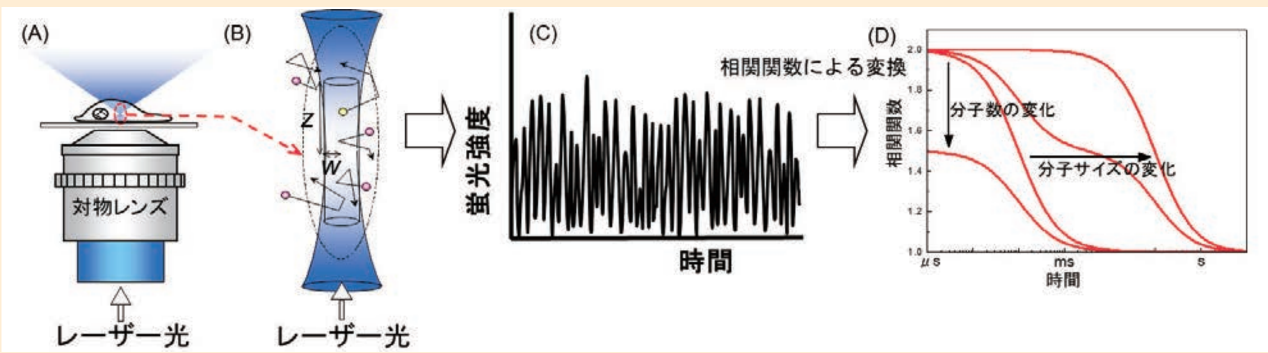


図1　蛍光相関分光法（FCS）の原理
A：対物レンズ上の生細胞内のFCS測定領域を示す。
B：FCSの測定領域は、半径（w）と軸長（2z）で示されるの共焦点領域となる。蛍光分子（O）がブラウン運動により通過している様子を示す。
C：FCS測定領域（B）を蛍光分子が通過するために発生する蛍光強度の揺らぎ。
D：蛍光強度揺らぎの相関関数を得る。相関関数の左右のシフトから分子の拡散定数を得て、分子サイズの変化を知る。相関関数のy軸切片から分子数を計算する。

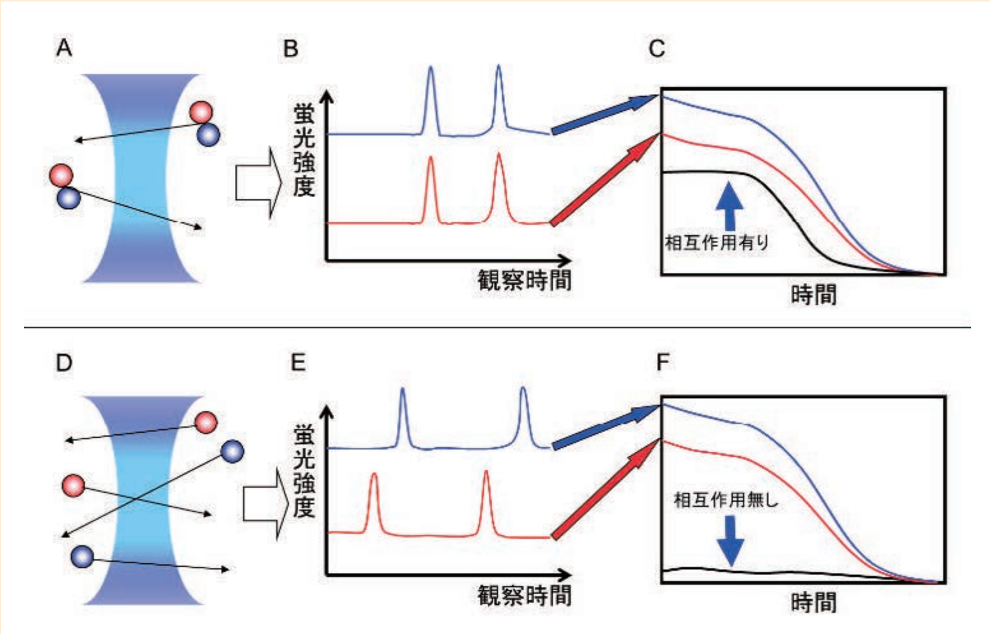


図 2　蛍光相互相関分光法（FCCS）の原理
A, D：FCCS の観察領域を通過する 2 種類の蛍光分子の動き。　B, E：観察される蛍光強度変化。
C, F：蛍光強度シグナルから求められる蛍光自己相関関数（赤、青）と相互相関関数（黒）。
（A）2 種類の蛍光色素になんらかの相互作用（結合、局在など）があると、（B）赤と青の同時シグナル変化が検出され、それぞれの蛍光の自己相関関数と、（C）2 つの掛け合わせである相互相関関数が求められる。
（D）2 種類の蛍光色素に相互作用がないと、（E）赤と青のシグナルに同時性はなく、（F）そのために低い相互相関関数となる。

4.　今後の発展

FCS/FCCS はその測定法の確立から既に 50 年近い歳月がたち、現在までに様々な改良が行われ、すでに目新しい方法ではないと述べた。しかし一方で、一般化しているかと言うと、そうではない。その大きな原因の 1 つは多くの FCS/FCCS 測定が共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を利用されているために装置の大型化と複雑さ、調整の煩雑さがある。何故なら FCS/FCCS の定量性を担保するためには、常に共焦点領域の大きさを一定に保つ必要がある。そのためにはレーザー光源、試料内の焦点位置と検出器側の焦点位置におけるピンホール位置を精密に合わせる共焦点合わせが必要となる。しかし、我々の提案した、ダイクロイックミラーの代わりに不等分割型光ファイバーを利用する方法[5]では、その共焦点位置合わせが必要なくなり、常に最適な条件での測定が可能となり研究者は測定に専念できることになる。種々の対物レンズの交換を行っても共焦点位置合わせのためのピンホール調整は必要なく、様々な条件検討も容易に可能である。(89 ページで商品をご紹介)

細胞内の新規構造体として、液 - 液相分離現象に基づく膜を持たないオルガネラやタンパク質凝縮体、細胞外に放出される細胞外微粒子や細胞外小胞（エクソソーム）など､ナノからマイクロメートルサイズに至る様々な『**細胞由来微粒子**』が存在し、その構造やサイズも多岐に渡る。それら細胞内外の微粒子状構造、形成過程や生理的な意義等についてはその多くが未解明である。それらの微粒子の中には様々なタンパク質が発現している。その中から幾つかの組み合わせを利用して、FCCS を利用して同時発現か否かを検出することで、細胞由来微粒子の同定が可能となることが期待される。

参考文献

1) 金城政孝．蛍光相関分光法の基礎．*原口・木村・平岡*，編．新・生細胞蛍光イメージング．共立出版 ; p. 193–221 (2015).
2) 金城政孝, 山本条太郎. 8, 1 細胞生物学における光ゆらぎ測定 ： 蛍光相関分光法. *柴山・佐藤・岩井・木村*, 編. 光散乱法の基礎と応用. 東京: 講談社 ; p. 287–316 (2014).
3) 山本条太郎，北村朗，金城政孝. 蛍光相関分光の発展と応用，その最新動向. **生物物理**. 59(3) 125–31, (2019).
4) 山本条太郎，金城政孝．回転および並進拡散測定による細胞内混雑状態の解析．**月刊 細胞**．53(6) 385–9, (2021).
5) Yamamoto J, Kinjo M. Full fiber-optic fluorescence correlation spectroscopy. ***Opt Express***.27(10) 14835, (2019).

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/ cf-RNA 精製
その他
受託サービス

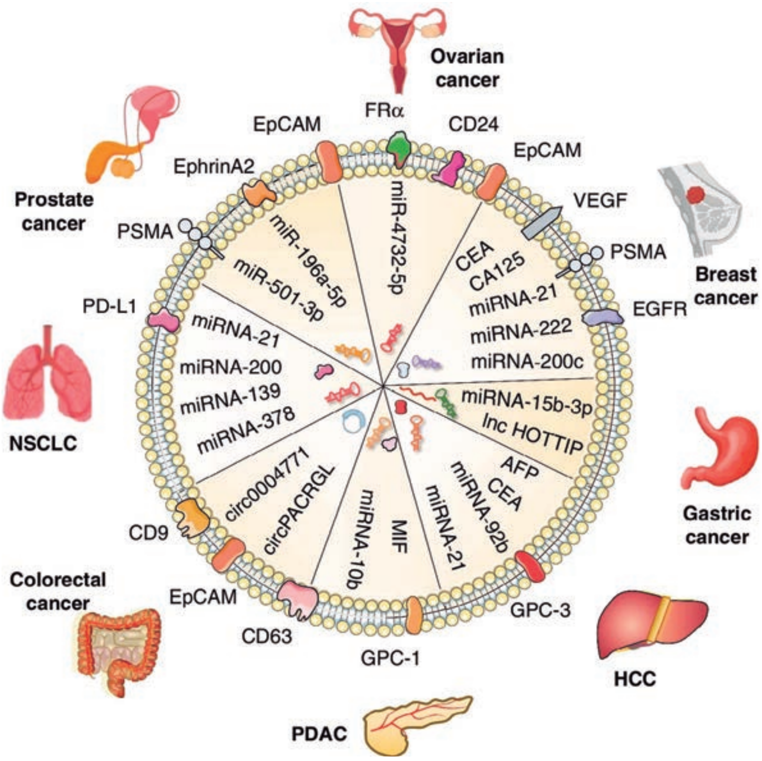
第３章　リキッドバイオプシー

Liquid biopsy

		商品／内容
97 ページ〜	循環セルフリー DNA 精製キット	循環セルフリー DNA 精製キット（血漿／血清用）
		循環セルフリー DNA 精製キット（尿用）
		cfPure® セルフリー DNA（cfDNA）精製キット（血漿／血清用）
101 ページ〜	循環セルフリー RNA 精製キット	尿用
103 ページ〜	エクソソーム精製 & 遊離循環 RNA 分離キット	血漿／血清用、尿用
105 ページ〜	遊離 RNA 精製キット	Slurry Format（血清／血漿用、全サイズ RNA 分離）
106 ページ〜	循環セルフリー & ウイルス核酸精製キット	血漿／血清用、尿用
108 ページ〜	cf-DNA / cf-RNA 保存チューブ	血漿中の cf-DNA / cf-RNA 保存チューブ
109 ページ〜	cf-DNA と腫瘍由来 EVsDNA	SeleCTEV™ DNA Enrichment Kit
110 ページ〜	ライブラリ調製	NEXTflex™ Cell Free DNA-Seq Kit 2.0
111 ページ〜	がん研究用のエクソソーム精製	evGAG Extracellular vesicles Purification Kit

がんの検出と治療におけるエクソソームのバイオマーカー

リキッドバイオプシー（Liquid Biopsy）には、組織（Liquid でなく Solid）を採取して生検をする従来の Biopsy に比べ、採取に伴う侵襲が少ないこと、何度も検査を実施しても患者の負担にならないことなどの長所があります。リキッドバイオプシーの研究はがんの検査への活用のためにも進められています。通常と発現量の異なるタンパク質や核酸を豊富に含むがん由来エクソソームが注目され、様々ながん早期診断、病期分類、予後予測のバイオマーカーとして研究が進んでいます。



参考文献

1) Figure from Yu *et al*. 2022.1 Reproduced under the Creative Commons license.
2) Yu, D., Li, Y., Wang, M., Gu, J., Xu, W., Cai, H., Fang, X., & Zhang, X. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. *Molecular Cancer 21* (2022). https://doi.org/10.1186/s12943-022-01509-9

エクソソーム

— 小さな「プレイヤー」が果たす大きな役割 —

エクソソームには、その内包物質、特異的な送達様式／細胞指向性、偏在性から、診断や薬物送達での応用が期待されています。エクソソームは分泌細胞に由来するタンパク質や核酸を含むため、疾病の診断やモニタリングに用いる研究が進められています[1)]。例えば、メラノーマ患者では血中エクソソームCD63濃度が上昇することが報告されています[2)]。また、タウタンパク質を含むエクソソームは、初期のアルツハイマー病の発症を検知するために使用できる可能性が示唆されています[3)]。

診断に応用できる可能性に加え、エクソソームは薬物送達システムへの応用も期待されています[4)]。現在のナノ粒子による薬物送達システムの欠点として、患部に到達する前に薬物が放出してしまうことや、免疫原性が高いといった点が挙げられます。しかし、エクソソームは免疫原性が低く、薬物を内包させることが可能であり、表面分子を介して特定の細胞を標的化することができます。また、エクソソームは血液脳関門（BBB、blood-brain barrier）を通過することができるほど小さいことから、神経変性疾患や脳腫瘍の治療に応用できる可能性があります[5)]。

最新の研究により、エクソソームの様々な役割が明らかになっています。例えば、Chengらは、エクソソームが心筋梗塞後の心臓組織修復に関与し、骨髄前駆細胞を動員するmiRNAを伝達することを示しました[6)]。また、テキサス大学医学部のRamkumar Menonのグループは、母親由来のエクソソームが成長中の胎児に送達され、組織機能に影響を及ぼす可能性があることを明らかにしました[7)]。がんに関する分野では、Chenらが転移性病変部位から分泌されるPD-L1を含むエクソソームが腫瘍による免疫抑制効果を増強し、がん免疫療法実施後の転帰不良と関連することを報告しています[8)]。最後に、Fanらは、がん細胞が既知の経路とは異なるエクソソーム形成経路を介して、発がん促進性エクソソームを分泌する可能性を示しました[9)]。

参考文献

1) CL Chen, *et al*. Comparative and targeted proteomic analyses of urinary microparticles from bladder cancer and hernia patients. *J Proteome Res*. 2012 Dec 7;11(12):5611-29.

2) M Logozzi, *et al*. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One*. 2009;4(4):e5219.

3) S Saman, *et al*. Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2012 Feb 3;287(6):3842-9.

4) N Arrighetti, *et al*. Exosome-like Nanovectors for Drug Delivery in Cancer. *Curr Med Chem*. 2019;26(33):6132-6148.

5) L Alvarez-Erviti, *et al*. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*. 2011 Apr;29(4):341-5.

6) M Cheng, *et al*. Circulating myocardial microRNAs from infarcted hearts are carried in exosomes and mobilise bone marrow progenitor cells. *Nat Commun*. 2019 Feb 27;10(1):959.

7) S Sheller-Miller, *et al*. Cyclic-recombinase-reporter mouse model to determine exosome communication and function during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2019 Nov;221(5):502.e1-502.e12.

8) G Chen, AC Huang, *et al*. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 2018 Aug;560(7718):382-386.

9) SJ Fan, B Kroeger, *et al*. Glutamine deprivation alters the origin and function of cancer cell exosomes. *EMBO J*. 2020 Aug 17;39(16):e103009.

プロテインテック社のエクソソーム研究用抗体は、71ページに掲載しています。

循環セルフリー DNA 精製キット（血漿／血清用）

NORGEN BIOTEK CORP.

スピンカラムだから簡単！無償サンプルもあります

PCR 阻害物質を含まない cfc-DNA を単離

血漿／血清サンプル（フレッシュ／凍結）から、PCR 阻害物質を含まない高品質な循環セルフリー DNA（cfc-DNA：cell-free circulating DNA）を、スピンカラム法により迅速に単離できるキットです。本キットは、血漿／血清サンプル（フレッシュ／凍結）から全てのサイズの cfc-DNA を単離し、使用目的に合わせた量（25 µL から 100 µL の範囲）で溶出することができます。精製した血漿／血清 cfc-DNA は、PCR・qPCR・メチル化感受性 PCR 法・サザンブロット解析・マイクロアレイ・次世代シーケンシング（NGS）等のアプリケーションに使用可能です。cf-DNA / cf-RNA 保存チューブから単離した血漿と組み合わせることも可能で、サンプル量に合わせて複数のキットからお選びいただけます。

構成内容

- ●結合バッファー
- ●プロテイナーゼ K
- ●溶液 WN
- ●洗浄溶液 A
- ●溶出バッファー B
- ●スピンカラム
- ●コレクションチューブ
- ●溶出チューブ（1.7 mL）

特長

- ●血漿・血清サンプルから全てのサイズの循環 DNA を迅速・簡単に精製
- ●循環 DNA を使用目的に合わせた溶出量に濃縮
- ●PCR 阻害物質を含まない循環セルフリー DNA を単離

使用例

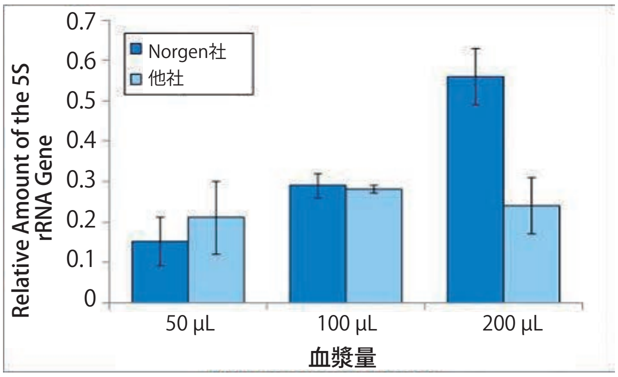


図 1　Micro キットを用いて、抗凝固剤としてクエン酸を添加した血液から調製した血清（50、100、200 µL）から循環 DNA を精製し、Q 社の同等商品と比較した。
精製した DNA 2 µL を qPCR のテンプレートとして使用し、精製したハウスキーピング 5S rRNA 遺伝子の相対量を評価した。5S rRNA 遺伝子の相対量は、インプットしたサンプル量に応じて、直線的に増加した。本キットは、他社商品と比較して、ハウスキーピング 5S rRNA 遺伝子の回収率が高いことが示された。

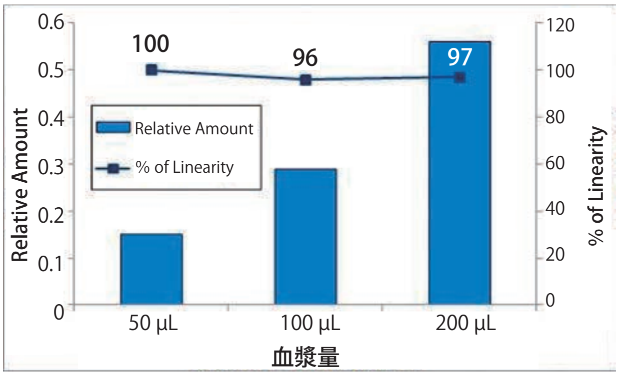


図 2　Micro キットを用いて、抗凝固剤としてクエン酸を添加した血液から調製した血清（50、100、200 µL）から、循環 DNA を精製した。
精製した DNA 2 µL を qPCR のテンプレートとして使用し、様々な量の血清から精製したハウスキーピング 5S rRNA 遺伝子の直線性を評価した。50 µL の血漿から精製した 5S rRNA 遺伝子量に対して、100 µL の血漿からの回収率は 96% であった。また、100 µL の血漿から精製した 5S rRNA 遺伝子量に対して、200 µL の血漿からの回収率は 97% であった。

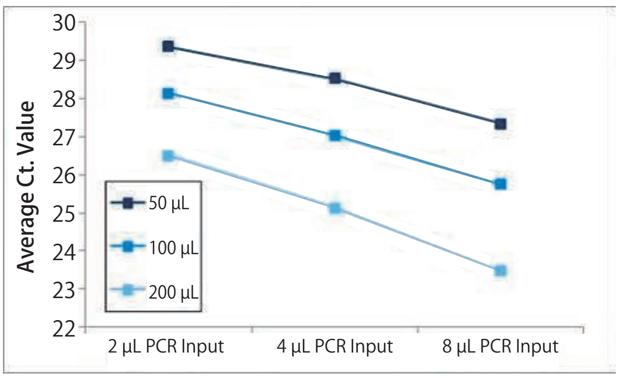


図 3　本キットを用いて、血清（50、100、200 µL）から DNA を単離した。
溶出量を増やした（2、4、8 µL）DNA を用いて、反応容量 20 µL で qPCR を行い、Ct 値の変動を検討した。テンプレート量の増加に伴い Ct 値が上昇する場合は、サンプル中に PCR 阻害物質が存在する可能性がある。溶出量を増やした DNA を qPCR のテンプレートに用いても Ct 値への影響は見られず、実際には、PCR インプット量の増加に伴い Ct 値が低下する傾向にあることから、本キットで精製した DNA は、血漿中に存在する一般的な阻害物質を含まないことが示される。

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/cf-RNA 精製
その他
受託サービス

仕様	血漿／血清用 循環セルフリー DNA 精製キット			
	Micro キット 品番：55500	Mini キット 品番：55100	Midi キット 品番：55600	Maxi キット 品番：55800
包装	50 プレップ	50 プレップ	20 プレップ	10 プレップ
サンプルの種類	血漿／血清			
抗凝固剤（血漿用）	EDTA ／クエン酸／ヘパリン			
対応できるサンプル量	10 ～ 200 μL	200 ～ 500 μL	1 ～ 4 mL	5 ～ 10 mL
最小溶出量	25 μL			
最大溶出量	50 μL			
10 回の精製にかかる時間	**15 ～ 20 分**	**15 ～ 20 分**	**40 ～ 45 分**	**40 ～ 45 分**
精製できる DNA のサイズ	≥ 50 bp			
平均的な収量	サンプルにより異なる			

［Norgen Biotek Corp.　メーカー略号：NOG］

品名	対応できるサンプル量	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
血漿／血清用 循環セルフリー DNA 精製 Micro キット	10 ～ 200 μL	55500	50 preps	¥60,000	室
血漿／血清用 循環セルフリー DNA 精製 Mini キット	200 ～ 500 μL	55100	50 preps	¥77,000	室
血漿／血清用 循環セルフリー DNA 精製 Midi キット	1 ～ 4 mL	55600	20 preps	¥92,000	室
血漿／血清用 循環セルフリー DNA 精製 Maxi キット	5 ～ 10 mL	55800	10 preps	¥56,000	室

循環セルフリー DNA 精製キット（尿用）

NORGEN BIOTEK CORP.

スピンカラムだから簡単！

尿サンプル（フレッシュ／保存／凍結のいずれも可）から、PCR 阻害物質を含まない高品質な循環セルフリー DNA（Cell-Free Circulating DNA）を精製・濃縮するキットです。精製した尿中 DNA は、PCR、qPCR、メチル化感受性制限酵素 PCR、サザンブロット分析、マイクロアレイ、次世代シーケンシング（NGS）などにご使用いただけます。

特長

- ●尿サンプル（フレッシュ／保存／凍結）から全てのサイズの循環 DNA（circulating DNA）を分離
- ●循環 DNA を使用目的に応じた溶出量に濃縮（50 ～ 100 μL）
- ●PCR 阻害物質を含まない循環セルフリー DNA を分離
- ●一般的な尿防腐剤に対応

構成内容

- ●結合溶液 K
- ●溶解バッファー A
- ●プロテイナーゼ K
- ●洗浄溶液 A
- ●溶出バッファー B
- ●スピンカラム
- ●コレクションチューブ
- ●溶出チューブ（1.7 mL）

仕様	Mini キット 品番：56600	Midi キット 品番：56700	Maxi キット 品番：56800
サンプルの種類	フレッシュ／凍結した尿		
サンプル量	250 μL ～ 2 mL	2 ～ 10 mL	10 ～ 30 mL
溶出量	50 ～ 100 μL		
精製に要する時間	**15 ～ 20 分**	**40 ～ 45 分**	**40 ～ 45 分**
精製できる DNA のサイズ	≥ 50 bp		
収量	サンプルにより異なる		

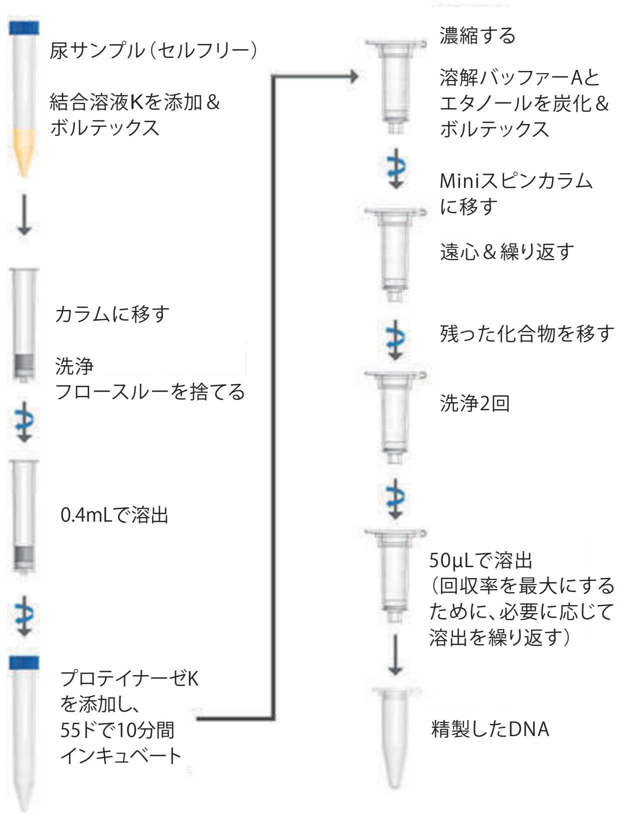


図 1　Midi キット（品番：56700）プロトコール

使用例

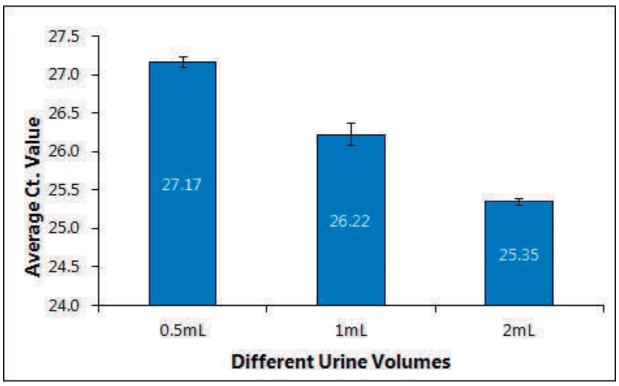


図 2　異なる量の尿サンプルを用いた循環セルフリー DNA の精製
本キットを用いて、500 μL、1 mL、2 mL のフレッシュな尿から循環 DNA（circulating DNA）を精製した。精製した DNA 2 μL を qPCR のテンプレートとして使用し、精製したハウスキーピング遺伝子 5S rRNA の相対量を評価した。5S rRNA 遺伝子の相対量は、サンプル量に応じて直線的に増加した。

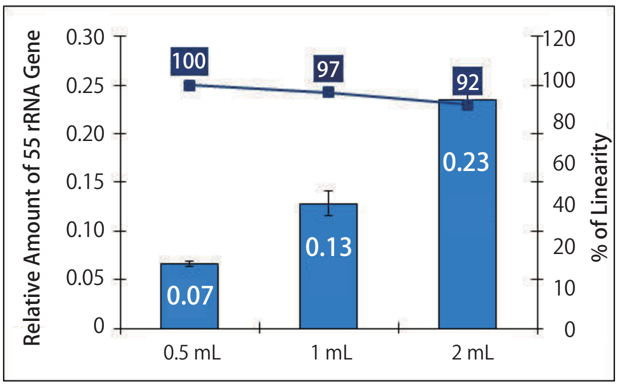


図 3　尿サンプル量の増加に対応した DNA 収量の直線性
本キットを用いて、500 μL、1 mL、2 mL のフレッシュな尿から循環 DNA（circulating DNA）を精製した。精製した DNA 2 μL を qPCR のテンプレートとして使用し、異なる量の尿から精製した ハウスキーピング遺伝子 5S rRNA 量の直線性を評価した。500 μL の尿から精製した 5S rRNA 遺伝子量に対して、1 mL の尿からの回収率は 97% であった。また、1 mL の尿から精製した 5S rRNA 遺伝子量に対して、2 mL の尿からの回収率は 92% であった。

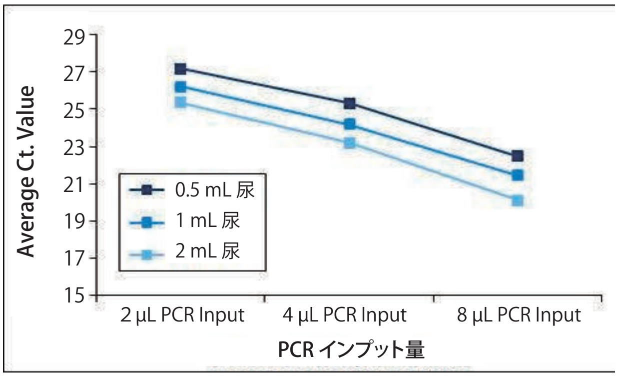


図 4　尿中循環セルフリー DNA に含まれる阻害物質量の測定
本キットを用いて、500 µL、1 mL、2 mL の尿から DNA を単離した。溶出量を増やした（2、4、8 µL）DNA を用いて、反応容量 20 µL で qPCR を行い、Ct 値の変動を検討した。テンプレート量の増加に伴い Ct 値が上昇する場合は、サンプル中に PCR 阻害物質が存在する可能性がある。溶出量を増やした DNA を qPCR のテンプレートに用いても Ct 値への影響は見られず、テンプレート量の増加に伴い Ct 値が低下する傾向にあることから、本キットで精製した DNA は尿中に存在する一般的な阻害物質を含まないことが示される。

［Norgen Biotek Corp.　　メーカー略号：NOG］

品名	サンプル量	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
尿用循環セルフリー DNA 精製 Mini キット	250 µL ～ 2 mL	56600	50 preps	¥91,000	室
尿用循環セルフリー DNA 精製 Midi キット	2 ～ 10 mL	56700	20 preps	¥97,000	室
尿用循環セルフリー DNA 精製 Maxi キット	10 ～ 30 mL	56800	10 preps	¥57,000	室

cf-DNA/cf-RNA 精製 ▶▶▶　cf-DNA　WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 17715

cfPure® セルフリー DNA（cfDNA）精製キット（血漿／血清用）

BioChain® ISO 9001 & 13485 Registered Company

血漿・血清中のセルフリー DNA を分離・精製するキットです。シリカでコートされた常磁性粒子によって、1 mL 以下の少量から 10 mL 以上の大容量までの血清や血漿に含まれる cfDNA の精製が可能です。回収した DNA は qPCR や NGS、バイサルファイトシーケンスなど幅広いアッセイにご使用いただけます。

特長

●磁気ビーズによる分離・精製
●再現性が高く、高収量・高効率
●アッセイ時間が短く、スケール調整が可能
●回収した DNA は様々なアッセイに使用可能

回収後に適用可能なアッセイ

●PCR
●qPCR
●次世代シーケンス
●バイサルファイトシーケンス

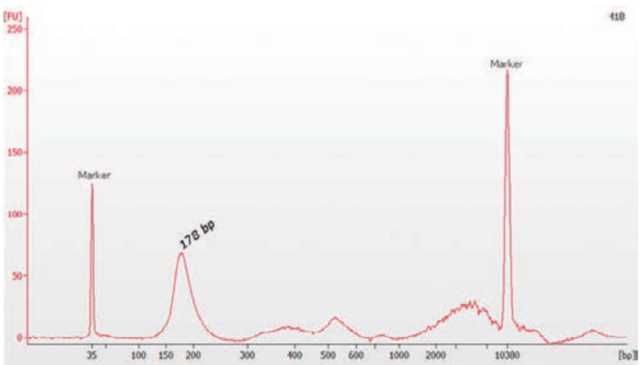


図　健常ドナー由来プラズマ 5 mL から DNA を抽出したところ 150 ～ 200 bp に 28.3 ng の cfDNA が抽出できた。

Plasma ID	Total DNA Recovered（ng）
A	7
	7.05
B	32.45
	33.5
C	26.8
	27.7
D	10.9
	10.9

表 1　4 ドナーのプラズマ 1 mL から抽出した DNA 量
2 回の実験間で抽出量にほぼ差はなかった。

抽出キット	サンプル番号	血漿 1 mL あたりの cfDNA の収量（ng）	plasma 1 mL あたりの 115 nt ALU シーケンス cfDNA 回収量（ng）
他社商品	1	4.99	1.97
本商品		6.35	2.53
他社商品	2	6.18	3.21
本商品		8.28	3.93
他社商品	3	6.93	3.79
本商品		7.5	3.87

表 2　他社との性能比較
3 ドナーの plasma 2 mL から DNA 抽出を行った cfDNA 量は他社製の磁気ビーズ式のキットよりも多くの収量が得られた。
また cfDNA 内の ALU シーケンス量を qPCR により確認したところ、他社より多くの ALU シーケンス量が確認できた。

Sample Name	他社商品		本商品	
On-Target Reads	0.993	0.994	0.994	0.994
Mapped Reads	0.974	0.992	0.966	0.991

表 3　NGS でのシーケンス結果の比較
抽出した cfDNA を NGS により解析したところ、ターゲットおよびマップのリード結果に差は見られなかった。

［BioChain Institute Inc.　　メーカー略号：BCH］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
cfPure® Cell Free DNA Extraction Kit	K5011610	1 kit（100 mL）	¥100,500	室
	K5011625	1 kit（250 mL）	¥176,000	室

循環セルフリー RNA 精製キット（尿用）

NORGEN BIOTEK CORP.

尿サンプルから Cell-Free Circulating RNA を精製・濃縮

尿サンプル（フレッシュ／保存／凍結のいずれも可）から、PCR 阻害物質を含まない高品質な循環セルフリー RNA（エクソソーム RNA、ウイルス RNA を含む）を精製・濃縮できるキットです。

精製した尿中 RNA は、PCR、qPCR、メチル化感受性逆転写 qPCR（methylation-sensitive reverse transcription qPCR）、RT-PCR、ノーザンブロット法、RNase プロテクションアッセイ、プライマー伸長法、発現アレイ、次世代シーケンシング（NGS）などにご使用いただけます。

ご使用になる尿サンプル量に対応した、3 種のスケールのキットをご用意しております。

背景

■ 尿中の循環セルフリー RNA（cf-RNA）

尿検体からがんバイオマーカーを検出する利点は、非侵襲性でありながら大量に検体を採取できることです。また、同一の人物から繰り返し検体を採取することが可能であることから、長期的な研究が容易です。

がんバイオマーカーの探索に、血液や組織サンプル、その他の体液ではなく、尿の核酸を用いる利点として、以下の 3 点があげられます。

（1）尿を介して HIV に感染する可能性はなく、その他の多くの病原体に感染する可能性も低い

（2）尿の核酸の特性は血漿や血清と同様である

（3）尿はタンパク質濃度が低く（血液の 1,000 倍低い）、核酸の精製が技術的に容易である

特長

- ●全てのサイズの循環 RNA（circulating RNA）、エクソソーム由来の RNA（exosomal RNA）、miRNA（microRNA）を分離
- ●様々な量の尿サンプルに対応（3 種の包装のキットをご用意）
- ●フェノール抽出不要
- ●キャリア RNA 不要
- ●循環 RNA・エクソソーム RNA を使用目的に応じた溶出量に濃縮（50 ～ 100 µL）
- ●短時間で高品質な RNA を精製（Mini キット：25 ～ 30 分、Midi キット／ Maxi キット：40 ～ 45 分）

アプリケーション

精製した RNA は、様々な分子生物学実験にご使用いただけます。

- ●RT-qPCR（Reverse transcription qPCR）
- ●RT-PCR（Reverse transcription PCR）
- ●ノーザンブロット
- ●RNase プロテクションアッセイおよびプライマー伸長法
- ●発現アレイ
- ●miRNA アレイ
- ●RNA-Seq（RNA シーケンシング）
- ●Nanostring
- ●Fluidigm
- ●Droplet / Digital PCR

構成内容

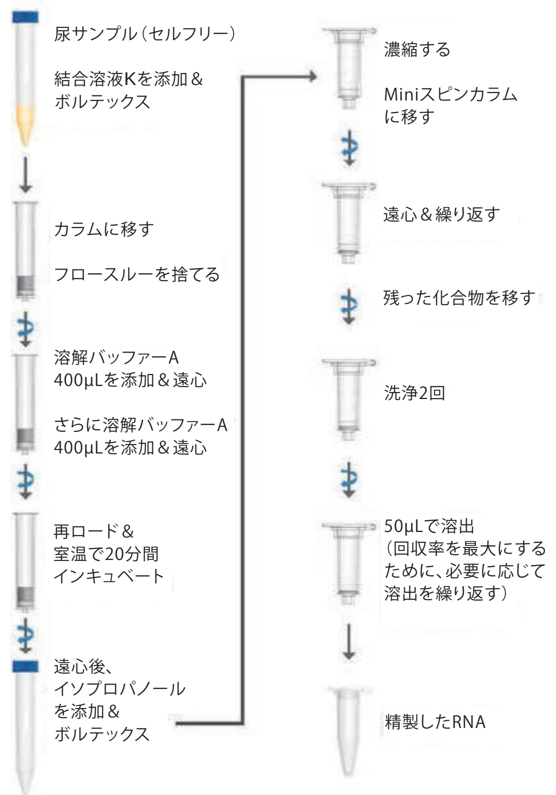
仕様	Mini キット 品番：56900	Midi キット 品番：57000	Maxi キット 品番：57100
回数	50 プレップ	20 プレップ	10 プレップ
結合溶液 K	25 mL	75 mL	1 × 75 mL 1 × 25 mL
溶解バッファー A	30 mL	20 mL	20 mL
洗浄溶液 A	18 mL		
溶出溶液 A	6 mL		
Mini スピンカラム	50	20	10
Midi スピンカラム	—	20	—
Maxi スピンカラム	—	—	10
コレクション チューブ	50	20	10
溶出チューブ （1.7 mL）	50	20	10

各キットの比較

仕様	Mini キット 品番：56900	Midi キット 品番：57000	Maxi キット 品番：57100
サンプルの種類	フレッシュ／凍結した尿		
サンプル量	250 µL ～ 2 mL	2 ～ 10 mL	10 ～ 30 mL
溶出量	50 ～ 100 µL		
精製に要する時間	25 ～ 30 分	40 ～ 45 分	40 ～ 45 分
精製できる RNA のサイズ	全てのサイズ、miRNA および small RNA（< 200 nt）を含む		
収量	サンプルにより異なる		

プロトコール

■ Midi キット（品番：57000）プロトコール



次のページへ続く

使用例

■ Mini キット（品番：56900）の使用例

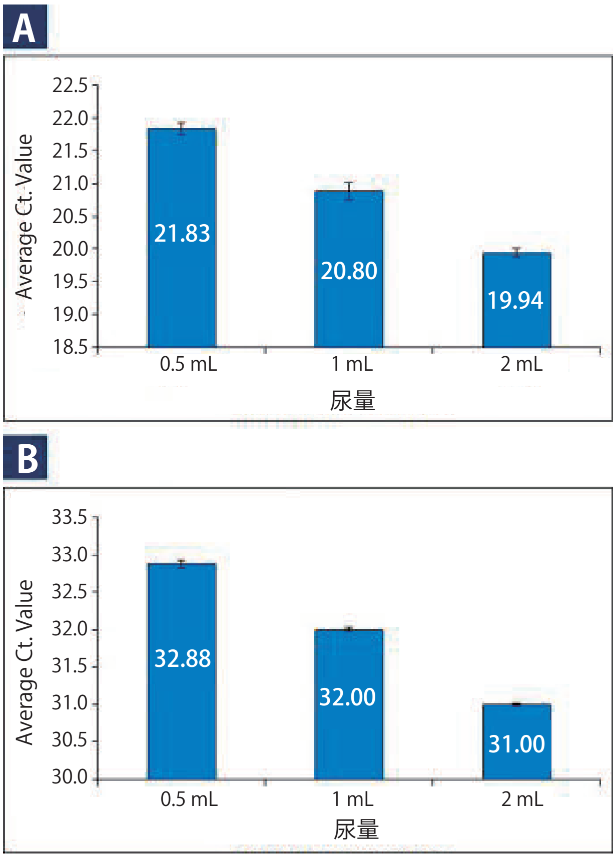


図 1　異なる量の尿サンプルを用いた循環セルフリー RNA およびエクソソーム由来の RNA 精製
本キットを用いて、0.5、1、2 mL の尿サンプルから循環セルフリー RNA（cell-free circulating RNA）およびエクソソーム由来の RNA を精製した。精製した RNA 2 μL を RT-qPCR のテンプレートとして使用し、精製したハウスキーピング遺伝子 5S rRNA 転写物（A）および miR-21（B）の増幅を評価した。5S rRNA 転写物（A）および miR-21（B）の平均 Ct 値は、どちらもサンプル量の増加に応じて直線的に低下した。

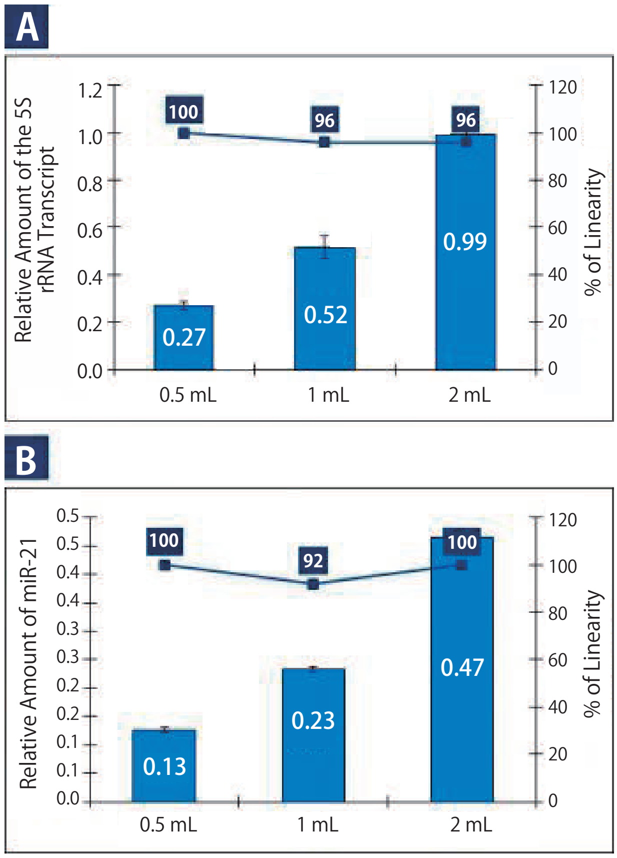


図 2　尿サンプル量の増加に対応した RNA 収量の直線性
本キットを用いて、0.5、1、2 mL の尿サンプルから循環セルフリー RNA（Cell-Free Circulating RNA）を精製した。精製した RNA 2 μL を RT-qPCR のテンプレートとして使用し、異なる量の尿から精製したハウスキーピング遺伝子 5S rRNA 転写物（A）および miR-21（B）量の直線性を評価した。
0.5 mL の尿中に存在する 5S rRNA 転写物の量に対して、1 mL の尿からの回収率は 96% であった。また、1 mL の尿中に存在する 5S rRNA 転写物の量に対して、2 mL の尿からの回収率は 96% であった。
miR-21 については、0.5 mL の尿中に存在する miR-21 量に対して、1 mL の尿からの回収率は 92% であった。また、1 mL の尿中に存在する miR-21 量に対して、2 mL の尿からの回収率は 100% であった。

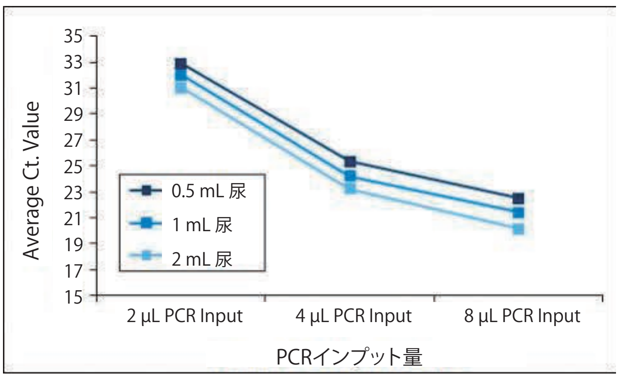


図 3　尿中循環セルフリー RNA に含まれる阻害物質量の測定
本キットを用いて、0.5、1、2 mL の尿から RNA を単離した。溶出量を増やした（2、4、8 μL）RNA を用いて、反応容量 20 μL で qPCR を行い、Ct 値の変動を検討した。テンプレート量の増加に伴い Ct 値が上昇する場合は、サンプル中に PCR 阻害物質が存在する可能性がある。溶出量を増やした RNA を qPCR のテンプレートに用いても Ct 値への影響は見られず、テンプレート量の増加に伴い Ct 値が低下する傾向にあることから、本キットで精製した RNA は尿中に存在する一般的な阻害物質を含まないことが示される。

［Norgen Biotek Corp.　　メーカー略号：NOG］

品名	対応サンプル量	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Urine Cell-Free Circulating RNA Purification Mini Kit	250 μL ～ 2 mL	56900	50 preps	¥97,000	室
Urine Cell-Free Circulating RNA Purification Midi Kit	2 ～ 10 mL	57000	20 preps	¥95,000	室
Urine Cell-Free Circulating RNA Purification Maxi Kit	10 ～ 30 mL	57100	10 preps	¥58,000	室

エクソソーム精製 & 遊離循環 RNA 分離キット（血漿／血清用）

NORGEN BIOTEK CORP.

血清または血漿サンプルからエクソソームの精製とエクソソーム由来の RNA の単離、さらには遊離循環 RNA の単離を連続して行うことができるキットです。本キットは、Norgen 社独自のスピンカラムクロマトグラフィーを用いて、全てのサイズのエクソソームまたは細胞外小胞（extracellular vesicles）由来の RNA、遊離循環 RNA を精製することができます。

他社のキットとは異なり、特別な装置や沈殿試薬、フェノール／クロロホルム抽出やプロテアーゼ処理は必要ありません。また、使用目的に合わせて溶出量を調整することができます（50 ～ 100 μL）。精製後の遊離循環 RNA は、エクソソーム由来の RNA を含まず、PCR、qPCR、RT-PCR、ノーザンブロット法、RNase プロテクションアッセイ、プライマー伸長法、発現アレイなどにご使用いただけます。

特長

- miRNA を含む全サイズのエクソソーム／細胞外小胞由来の RNA、遊離循環 RNA を分離
- 様々な量の血清・血漿サンプルに対応（Mini キット：50 μL ～ 1 mL、Midi キット：1 ～ 4 mL、Maxi キット：4 ～ 10 mL）
- サイズや GC 含有量に関わらず全ての RNA を結合・溶出
- 時間を要する超遠心分離、ろ過、特別なシリンジは不要
- オーバーナイトインキュベーション不要
- 沈殿試薬のコンタミネーションなし

構成内容

- Slurry E
- ExoC バッファー
- ExoR バッファー
- 溶解バッファー A
- 溶解添加剤 B
- 洗浄溶液 A
- 溶出溶液 A
- Mini フィルタースピンカラム※
- Mini スピンカラム※
- コレクションチューブ
- 溶出チューブ（1.7 mL）

※ Midi キット、Maxi キットにも含まれます。

仕様

仕様	Mini キット 品番：59500	Midi キット 品番：59600	Maxi キット 品番：59700
サンプルの種類	血清／血漿		
サンプル量	50 μL ～ 1 mL	1 ～ 4 mL	4 ～ 10 mL
精製できる RNA のサイズ	全てのサイズ miRNA および small RNA（< 200 nt）を含む		
溶出量	50 ～ 100 μL		
10 回の精製にかかる時間	35 ～ 40 分	40 ～ 45 分	
平均的な収量	サンプル量により異なる		

使用例

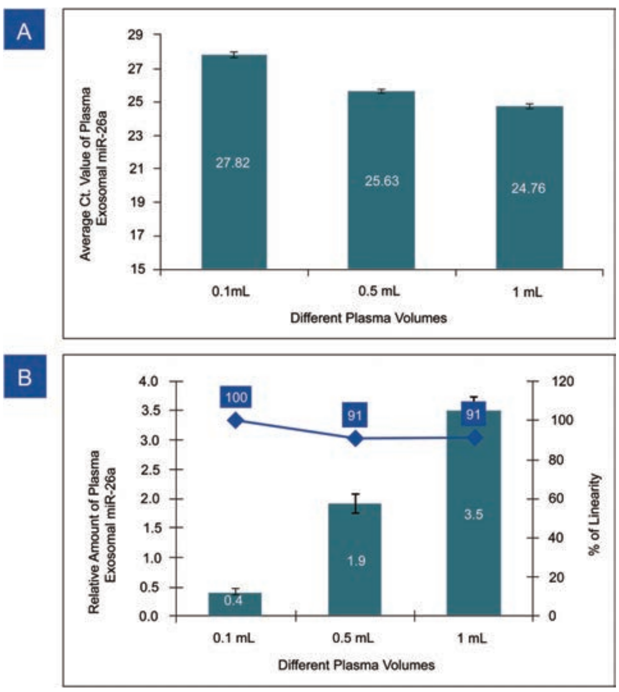


図 1　異なる量の血漿サンプルを用いたエクソソーム由来 RNA の精製
Mini キット（品番：59500）を用いて、エクソソーム由来の RNA を精製した。精製した RNA 2 μL を RT-qPCR のテンプレートとして使用し、血漿エクソソーム由来の miR-26a の増幅を評価した。
（A）miR-26a の平均 Ct 値は、どちらもサンプル量の増加に応じて直線的に低下した。
（B）血漿エクソソーム由来の miR-26a の相対量は、90% 以上の回収率を示し、サンプル量の増加に応じて直線的に増加した。

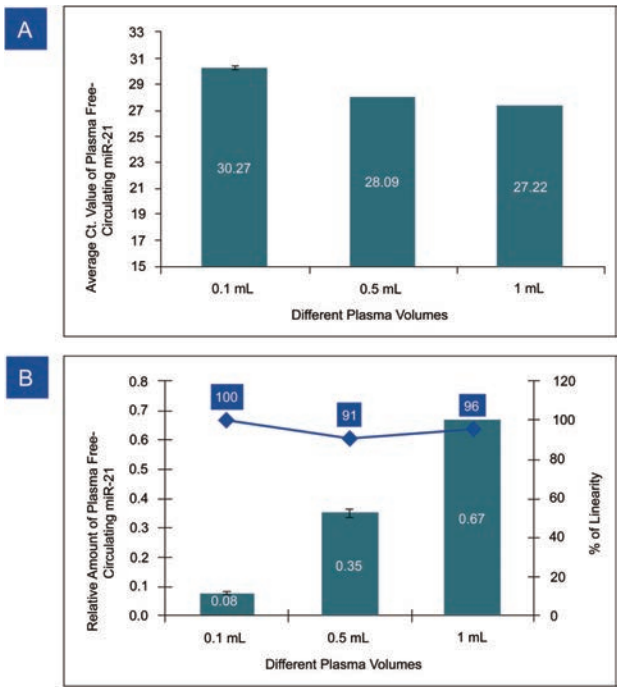


図 2　異なる量の血漿サンプルを用いた遊離循環 RNA の精製
Mini キット（品番：59500）を用いて、エクソソーム由来の RNA を分離後、遊離循環 RNA を精製した。精製した RNA 2 μL を RT-qPCR のテンプレートとして使用し、血漿中の遊離循環 RNA に含まれる miR-21 の増幅を評価した。
（A）miR-21 の平均 Ct 値は、どちらもサンプル量の増加に応じて直線的に低下した。
（B）血漿中の遊離循環 RNA に含まれる miR-21 の相対量は、90% 以上の回収率を示し、サンプル量の増加に応じて直線的に増加した。

[Norgen Biotek Corp.　メーカー略号：NOG]

品名	対応サンプル量	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Plasma/Serum Exosome and Free-Circulating RNA Isolation Mini Kit	50 μL ～ 1 mL	59500	50 preps	￥306,000	室
Plasma/Serum Exosome and Free-Circulating RNA Isolation Midi Kit	1 ～ 4 mL	59600	25 preps	￥262,000	室
Plasma/Serum Exosome and Free-Circulating RNA Isolation Maxi Kit	4 ～ 10 mL	59700	15 preps	￥197,000	室

エクソソーム精製 & 遊離循環 RNA 分離キット（尿用）

NORGEN BIOTEK CORP.

様々な量のサンプル量に対応可能

尿用 エクソソーム精製 & 遊離循環 RNA 分離キットは、尿サンプルからエクソソームの精製とエクソソーム由来の RNA の単離、さらには遊離循環 RNA の単離を連続して行うことができるキットです。本キットは、Norgen 社独自のスピンカラムクロマトグラフィーを用いて、全てのサイズのエクソソームまたは細胞外小胞（extracellular vesicles）由来の RNA、遊離循環 RNA を精製することができます。

他社のキットとは異なり、特別な装置や沈殿試薬、フェノール／クロロホルム抽出やプロテアーゼ処理は必要ありません。また、使用目的に合わせて溶出量を調整することができます（50 ～ 100 µL）。精製後の遊離循環 RNA は、エクソソーム由来の RNA を含まず、PCR、qPCR、RT-PCR、ノーザンブロット法、RNase プロテクションアッセイ、プライマー伸長法、発現アレイなどにご使用いただけます。

特長

- ●miRNA を含む全サイズのエクソソーム／細胞外小胞由来の RNA、遊離循環 RNA を分離
- ●様々な量の尿サンプルに対応（Mini キット：250 µL ～ 1 mL、Midi キット：2 ～ 10 mL、Maxi キット：11 ～ 30 mL）
- ●サイズや GC 含有量に関わらず全ての RNA を結合・溶出
- ●時間を要する超遠心分離、ろ過、特別なシリンジは不要
- ●オーバーナイトインキュベーション不要
- ●沈殿試薬のコンタミネーションなし

構成内容

- ●Slurry E
- ●ExoC バッファー
- ●ExoR バッファー
- ●溶解バッファー A
- ●溶解添加剤 B
- ●洗浄溶液 A
- ●溶出溶液 A
- ●Mini フィルタースピンカラム※
- ●Mini スピンカラム※
- ●コレクションチューブ
- ●溶出チューブ（1.7 mL）

※ Midi キット、Maxi キットにも含まれます。

仕様

仕様	Mini キット 品番：59200	Midi キット 品番：59300	Maxi キット 品番：59400
サンプルの種類	尿		
サンプル量	250 µL ～ 1 mL	2 ～ 10 mL	11 ～ 30 mL
精製できる RNA のサイズ	全てのサイズ miRNA および small RNA（< 200 nt）を含む		
溶出量	50 ～ 100 µL		
10 回の精製にかかる時間	35 ～ 40 分		40 ～ 45 分
平均的な収量	サンプル量により異なる		

使用例

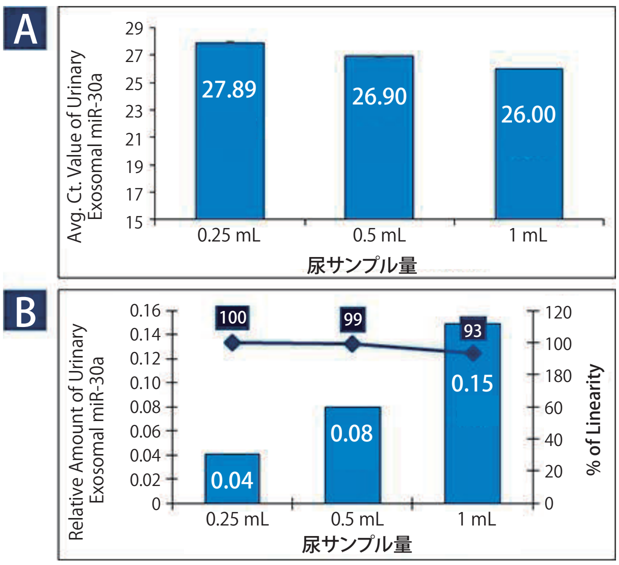


図 1　異なる量の尿サンプルを用いたエクソソーム由来 RNA の精製
Mini キット（品番：59200）を用いて、エクソソーム由来の RNA を精製した。精製した RNA 2 µL を RT-qPCR のテンプレートとして使用し、尿エクソソーム由来の miR-30a の増幅を評価した。
（A）miR-30a の平均 Ct 値は、どちらもサンプル量の増加に応じて直線的に低下した。
（B）尿エクソソーム由来の miR-30a の相対量は、90% 以上の回収率を示し、サンプル量の増加に応じて直線的に増加した。

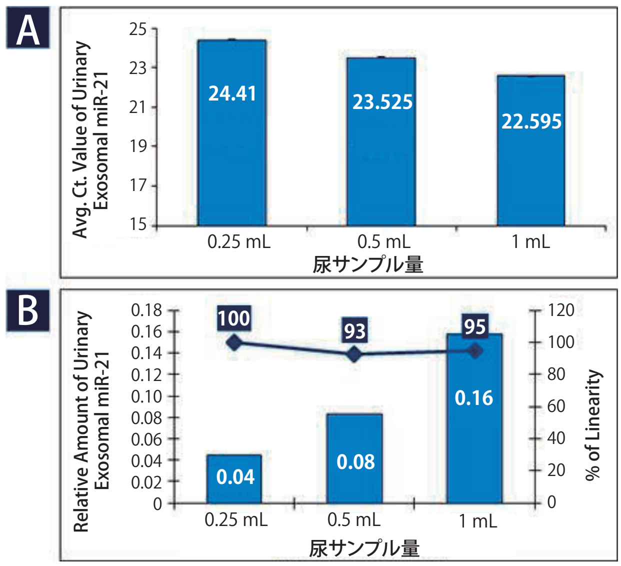


図 2　異なる量の尿サンプルを用いた遊離循環 RNA の精製
Mini キット（品番：59200）を用いて、エクソソーム由来の RNA を分離後、遊離循環 RNA を精製した。精製した RNA 2 µL を RT-qPCR のテンプレートとして使用し、尿中遊離循環 RNA に含まれる miR-21 の増幅を評価した。
（A）miR-21 の平均 Ct 値は、どちらもサンプル量の増加に応じて直線的に低下した。
（B）尿中遊離循環 RNA に含まれる miR-21 の相対量は、90% 以上の回収率を示し、サンプル量の増加に応じて直線的に増加した。

[Norgen Biotek Corp.　　メーカー略号：NOG]

品名	対応サンプル量	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Urine Exosome and Free-Circulating RNA Isolation Mini Kit	250 µL ～ 1 mL	59200	50 preps	¥338,000	室
Urine Exosome and Free-Circulating RNA Isolation Midi Kit	2 ～ 10 mL	59300	25 preps	¥302,000	室
Urine Exosome and Free-Circulating RNA Isolation Maxi Kit	4 ～ 10 mL	59400	15 preps	¥229,000	室

WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 9778

遊離 RNA 精製キット - Slurry Format（血清／血漿用、全サイズ RNA 分離）

NORGEN BIOTEK CORP.

循環 RNA やエクソソーム由来 RNA、さらには miRNA といった全サイズの RNA を分離

Norgen 社独自の樹脂が分離用マトリックスとして使用されており、循環 RNA やエクソソーム由来 RNA、さらには miRNA といった全サイズの RNA を分離することが可能です。凍結サンプルからの RNA 分離や低濃度のサンプル（ヒト血漿で 1 ～ 100 ng/mL 程度の循環 RNA）の濃縮も可能です。

通常、遊離循環 RNA やエクソソーム由来 RNA の収量はサンプル量に依存し、血清／血漿中の RNA 量は個人の健康状態や血中のヌクレアーゼレベルに依存します。本キットは EDTA もしくはクエン酸処理済の血液サンプルから調製した血清／血漿サンプルでも対応可能です。ただし、ヘパリン処理済サンプルは、ヘパリンが RT-PCR などのダウンストリームのアプリケーションに大きく干渉する恐れがあるため、使用しないでください。

分離した RNA は、溶出液に回収されます。回収した RNA はそのままダウンストリームアッセイにご使用いただけます。

ご注意

このキットは、EDTA またはクエン酸塩を用いて採取された、新鮮または凍結血清または血漿からのエクソソームの精製に適しています。採取した後の血漿サンプルにヘパリンを用いると、RT-PCR などの多くの下流アプリケーションに重大な干渉を与える可能性があるため、ヘパリンでは使用しないでください。

特長

- ●miRNA を含む全サイズの遊離 RNA を分離
- ●迅速かつ簡単な操作（スピンカラムタイプ）
- ●様々な量（0.25 ～ 5 mL）のサンプルに対応
- ●血清・血漿中の RNA を精製・濃縮
- ●阻害物質を含まない遊離 RNA を分離
- ●フェノール／クロロホルム不要

構成内容

- ●Slurry C2
- ●溶解バッファー
- ●洗浄液 A
- ●溶出液 A
- ●Mini フィルタースピンカラム
- ●回収用チューブ
- ●溶出用チューブ（1.7 mL）

仕様

商品	Mini キット 品番：51000	Maxi キット 品番：50900	スラリー 品番：42800
最小添加血清／血漿量	0.25 mL	2 mL	0.25 mL
最大添加血清／血漿量	2 mL	5 mL	5 mL
包装	50 preps	25 preps	50 preps
適用 RNA サイズ	全サイズ（miRNA を含む）		
精製時間	40 分以内		

使用例

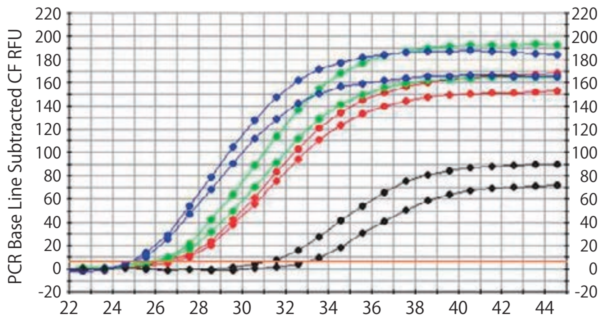


図 1　異なる血漿量からの循環 RNA の分離と検出
本キットを使用して、0.5 mL、1 mL、および 2 mL の血漿から循環 RNA を分離した。次に、3 μL の精製 RNA を RT-qPCR 反応のテンプレートとして使用し、ヒト 5S 遺伝子を検出した。
5S ハウスキーピング遺伝子は、使用したすべての血漿サンプル量から検出された。5S rRNA の増幅では、サンプル量の増加に伴って RNA の量が増加した。これは、Ct 値の減少によって表される。
0.5 mL 血漿から単離された RNA は赤色の線、1 mL 血漿から単離された RNA は緑色、2 mL 血漿から単離された RNA は青色の線で示す。黒い線はテンプレートなしのコントロールに対応する。

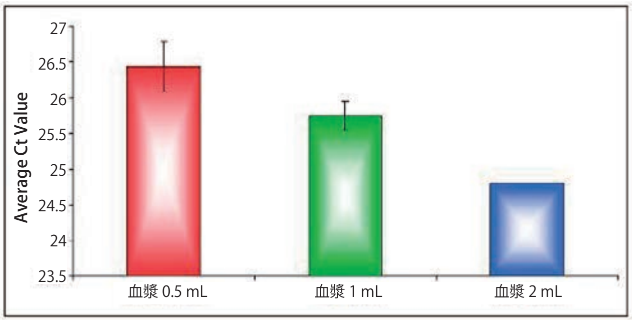


図 2
本キットを用いて、0.5、1、2 mL の血漿サンプルから遊離 RNA を単離・精製した。3 種類の精製 RNA をテンプレートとして、ヒト 5S 遺伝子検出の RT-qPCR を行った。5S 遺伝子はいずれのサンプル量からも検出された。5S の rRNA は、添加したサンプル量の増加に伴い増幅が大きくなった（図 1）。また、Ct 値は添加したサンプル量の増加に伴って低下した（図 2）。
赤：血漿サンプル 0.5 mL、緑：血漿サンプル 1 mL、
青：血漿サンプル 2 mL、黒：no template control

[Norgen Biotek Corp.　メーカー略号：NOG]

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Mini Kit (Slurry Format)	51000	50 preps	￥147,000	室
Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Maxi Kit (Slurry Format)	50900	25 preps	￥137,000	室
Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Kit (Slurry Format)	42800	50 preps	￥147,000	室

循環セルフリー & ウイルス核酸精製キット（血漿／血清用）

NORGEN BIOTEK CORP.

エクソソーム由来の RNA を含む cfc-DNA / RNA を精製

EDTA ／クエン酸を添加した血漿／血清サンプル（フレッシュ／凍結）から、エクソソーム由来の RNA を含む循環セルフリー DNA（cfc-DNA）/ RNA を、迅速に精製・濃縮できるキットです。精製した DNA / RNA は高品質で、PCR 阻害物質を含みません※。

精製した核酸は、PCR・qPCR・メチル化感受性逆転写 qPCR（methylation-sensitive reverse transcription qPCR）、RT-PCR・メチル化感受性 PCR・サザンブロット法・ノーザンブロット法・RNase プロテクションアッセイ・プライマー伸長法・発現アレイ・次世代シーケンシングなどのアプリケーションにご使用いただけます。

※ヘパリンを添加した血液から調製した血漿サンプルは、精製後の RT-PCR などの実験に影響するため、使用できません。

特長

- ●1 回の溶出で、全てのサイズの循環 DNA・循環 RNA・エクソソーム由来の RNA（micro RNA・ウイルス DNA / RNA を含む）を単離
- ●様々な量の血漿・血清サンプルに対応（詳細は表参照）
- ●フェノール抽出やキャリア RNA 不要
- ●サイズや GC 含量に関わらず、全ての RNA をバイアスなしで結合・溶出
- ●循環セルフリー DNA / RNA・ウイルス DNA / RNA を使用目的に合わせた溶出量に濃縮できる（3 種類の包装をご用意）
- ●短時間で高品質な RNA / DNA を精製（Mini キットは 15 ～ 20 分）
- ●Streck 社「Cell-Free DNA BCT® Tube」に対応

仕様	Mini キット 品番：56300	Midi キット 品番：56400	Maxi キット 品番：56500
包装	50 プレップ	20 プレップ	10 プレップ
サンプルの種類	血漿／血清		
抗凝固剤（血漿用）※	EDTA ／クエン酸		
サンプル量	50 ～ 200 μL	250 μL ～ 1.5 mL	2 ～ 5 mL
最小溶出量	10 μL	50 μL	50 μL
最大溶出量	25 μL	100 μL	100 μL
10 回の精製にかかる時間	15 ～ 20 分	35 ～ 40 分	35 ～ 40 分
精製できる RNA のサイズ	全てのサイズ miRNA および small RNA（< 200 nt）を含む		
精製できる DNA のサイズ	≥ 50 bp		
平均的な収量	サンプルにより異なる		

※ EDTA ／クエン酸を添加した血液から調製した、フレッシュ／凍結した血清／血漿からの全核酸（RNA および DNA）の精製に適しています。
ヘパリンを添加した血液から調製した血漿サンプルは使用しないでください。特に、主に RNA に関する実験を行う場合、ヘパリンが精製後の RT-PCR などの実験に影響する可能性があります。主に DNA に関する実験の場合は、ヘパリンを添加した血漿を使用することができます。

構成内容	Mini キット 品番：56300	Midi キット 品番：56400	Maxi キット 品番：56500
溶解バッファー A	2 × 20 mL	100 mL	1 × 130 mL 1 × 30mL
洗浄溶液 A	18 mL	1 × 38 mL 1 × 18 mL	38 mL
溶出バッファー F	6 mL	15 mL	15 mL
Micro スピンカラム	50	—	—
Mini スピンカラム	—	20	10
Midi スピンカラム	—	20	—
Maxi スピンカラム	—	—	10
コレクションチューブ	50	20	10
溶出チューブ（1.7 mL）	50	20	10

使用例

■ Mini キット（品番：56300）の使用例

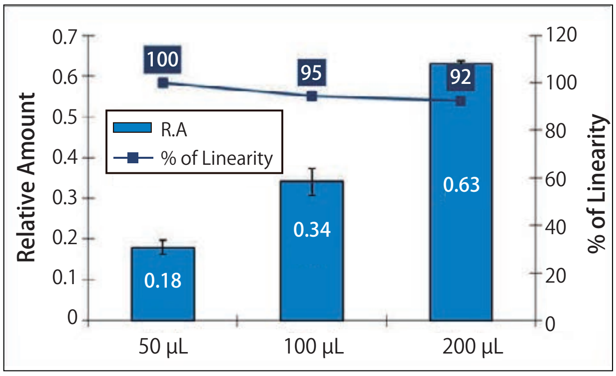


図 1　様々な量の血漿から精製した RNA の直線性
本キットを用いて、抗凝固剤としてクエン酸を添加した血液から調製した血清（50、100、200 μL）から RNA を精製した。精製した RNA 2 μL を RTqPCR のテンプレートとして使用し、様々な量の血漿から精製した miR-21 の直線性を評価した。50 μL の血漿から精製した miR-21 量に対して、100 μL の血漿からの回収率は 95% であった。また、100 μL の血漿から精製した miR-21 量に対して、200 μL の血漿からの回収率は 92% であった。

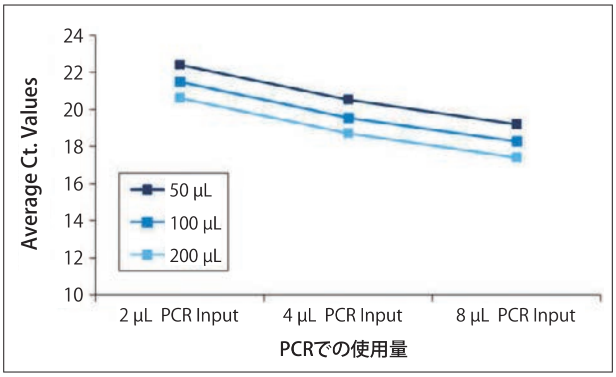


図 2　血漿 RNA サンプル中に存在する阻害物質量の測定
本キットを用いて、血漿（50、100、200 μL）から RNA を単離した。様々な量で溶出した RNA（2、4、8 μL）を用いて、反応容量 20 μL で逆転写反応を行った後に qPCR により増幅し、Ct 値の変動を検討した。テンプレート量の増加に伴い Ct 値が上昇する場合は、サンプル中に PCR 阻害物質が存在する可能性がある。逆転写反応のテンプレートとして用いる PCR インプット量が増加しても、miR-21 qPCR の Ct 値に影響は見られなかった。実際には、PCR インプット量の増加に伴い、Ct 値が低下する傾向にあることから、本キットで精製した RNA は、血漿中に存在する一般的な阻害物質を含まないことが示される。

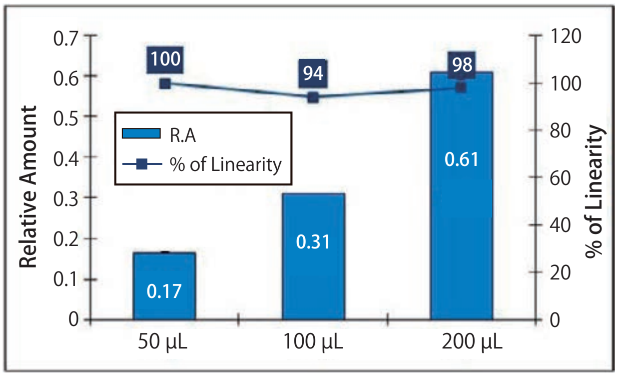


図 3　様々な量の血漿から精製した DNA の直線性
本キットを用いて、抗凝固剤としてクエン酸を添加した血液から調製した血漿（50、100、200 μL）から、循環 DNA を精製した。精製 DNA 2 μL を qPCR のテンプレートとして使用し、様々な量の血漿から精製したハウスキーピング遺伝子 5S rRNA 量の直線性を評価した。50 μL の血漿から精製した 5S rRNA 遺伝子量に対して、100 μL の血漿からの回収率は 94% であった。また、100 μL の血漿から精製した 5S rRNA 遺伝子量に対して、200 μL 血漿からの回収率は 98% であった。

［Norgen Biotek Corp.　メーカー略号：NOG］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Plasma/Serum Cell-Free Circulating and Viral Nucleic Acid Purification Mini Kit	56300	50 preps	¥104,000	室
Plasma/Serum Cell-Free Circulating and Viral Nucleic Acid Purification Midi Kit	56400	20 preps	¥90,000	室
Plasma/Serum Cell-Free Circulating and Viral Nucleic Acid Purification Maxi Kit	56500	10 preps	¥53,000	室

cf-DNA/cf-RNA 精製 ▶▶▶ cf-DNA/cf-RNA　　WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 15814

循環セルフリー & ウイルス核酸精製キット（尿用）

NORGEN BIOTEK CORP.

エクソソーム由来の RNA を含む cfc-DNA / RNA を精製

尿（フレッシュ／凍結／保存）から、エクソソーム由来の RNA を含む循環セルフリー DNA（cfc-DNA）やウイルス DNA / RNA を、迅速に精製・濃縮できるキットです。精製した DNA / RNA は高品質で、PCR 阻害物質を含みません。

本キットは、Norgen 社独自のスピンカラムクロマトグラフィーを用いて、全てのサイズの cfc-DNA・循環 RNA（microRNA を含む）・エクソソーム由来の RNA を精製することができます。他社のキットとは異なり、フェノール／クロロホルム抽出やプロテアーゼ処理の必要がありません。また、使用目的に合わせて、50 μL から 100 μL の量で溶出することが可能です。精製した核酸は、PCR・qPCR・メチル化感受性逆転写 qPCR（methylation-sensitive reverse transcription qPCR）、RT-PCR、メチル化感受性 PCR、サザンブロット法、ノーザンブロット法、RNase プロテクションアッセイ、プライマー伸長法、発現アレイ、次世代シーケンシング（NGS）などのアプリケーションにご使用いただけます。

サンプル量に合わせて、Mini キット、Midi キット、Maxi キットからお選びいただけます。

特長

- ●1 回の溶出で、全てのサイズの循環 DNA・循環 RNA・エクソソーム由来の RNA（micro RNA・ウイルス DNA / RNA を含む）を単離
- ●様々な量の尿サンプルに対応（詳細は表参照）
- ●フェノール抽出やキャリア RNA 不要
- ●サイズや GC 含量に関わらず、全ての RNA をバイアスなしで結合・溶出
- ●循環セルフリー DNA / RNA、ウイルス DNA / RNA を目的に合わせた溶出量に濃縮できる（Mini / Midi / Maxi キット：50 ～ 100 μL）
- ●短時間で高品質な RNA / DNA を精製（Mini キットは 25 ～ 30 分）
- ●様々な尿サンプル（新鮮／凍結／保存）に対応

使用例

■ Mini キット（品番：59900）の使用例

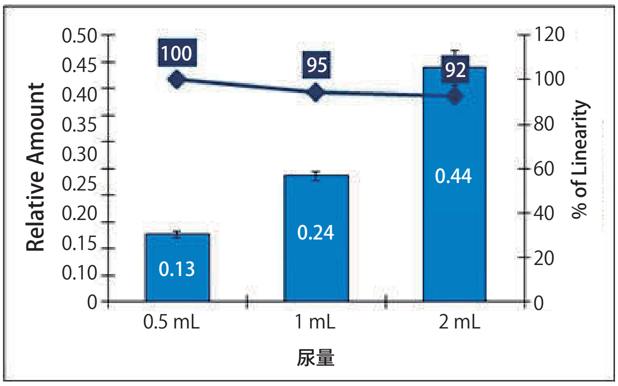


図 1　様々な量の尿から精製した RNA の直線性
本キットを用いて、尿（500 μL、1 mL、2 mL）から RNA を精製した。精製 RNA2 μL を RT-qPCR のテンプレートとして使用し、様々な量の尿から精製した miR-21 の直線性を評価した。本キットは、500 μL の尿から精製した miR-21 量に対して、1 mL の尿からの回収率は 95% であった。また、1 mL の尿から精製した miR-21 量に対して、2 mL の尿からの回収率は 92% であった。

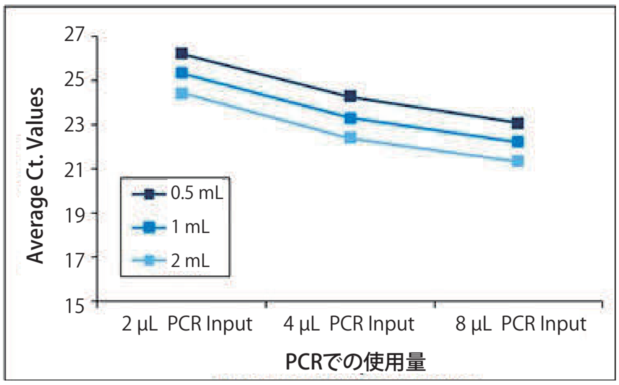


図 2　尿 RNA サンプル中に存在する阻害物質量の測定
本キットを用いて、尿（500 μL、1 mL、2 mL）から RNA を単離した。様々な量で溶出した RNA（2、4、8 μL）を用いて、反応容量 20 μL で逆転写反応を行った後に qPCR により増幅し、Ct 値の変動を検討した。テンプレート量の増加に伴い Ct 値が上昇する場合は、サンプル中に PCR 阻害物質が存在する可能性がある。逆転写反応のテンプレートとして用いる PCR インプット量が増加しても、miR-21 qPCR の Ct 値に影響は見られなかった。実際には、PCR インプット量の増加に伴い、Ct 値が低下する傾向にあることから、本キットで精製した RNA は、尿中に存在する一般的な阻害物質を含まないことが示される。

次のページへ続く

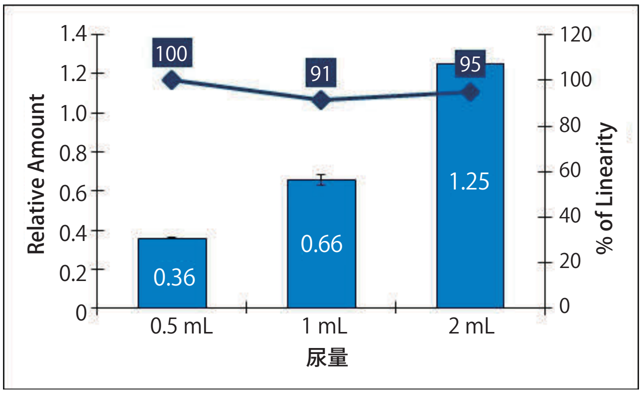


図 3　様々な量の尿から精製した DNA の直線性
本キットを用いて、尿（500 µL、1 mL、2 mL）から循環 DNA を精製した。精製 DNA 2 µL を qPCR のテンプレートとして使用し、様々な量の尿から精製したハウスキーピング遺伝子 5S rRNA 量の直線性を評価した。500 µL の尿から精製した 5S rRNA 遺伝子量に対して、1 mL の尿からの回収率は 91% であった。また、1 mL の尿から精製した 5S rRNA 遺伝子量に対して、2 mL の尿からの回収率は 95% であった。

仕様	Mini キット 品番：59900	Midi キット 品番：60000	Maxi キット 品番：60100
サンプルの種類	フレッシュ／凍結した尿		
サンプル量	250 µL ～ 2 mL	2 ～ 10 mL	10 ～ 30 mL
最小溶出量	50 µL		
最大溶出量	100 µL		
10 回の精製にかかる時間	25 ～ 30 分	40 ～ 45 分	45 ～ 50 分
精製できる DNA のサイズ	≥ 50 bp		
精製できる RNA のサイズ	全てのサイズ miRNA および small RNA（< 200 nt）を含む		
平均的な収量	サンプルにより異なる		

構成内容	Mini キット 品番：59900	Midi キット 品番：60000	Maxi キット 品番：60100
包装	50 プレップ	20 プレップ	10 プレップ
結合溶液 K	25 mL	75 mL	1 × 75 mL 1 × 25 mL
溶解バッファー A	30 mL	20 mL	20 mL
洗浄溶液 A	18 mL		
溶出バッファー F	6 mL		
Mini スピンカラム	50	20	10
Midi スピンカラム	—	20	—
Maxi スピンカラム	—	—	10
コレクションチューブ	50	20	10
溶出チューブ（1.7 mL）	50	20	10

［Norgen Biotek Corp.　　メーカー略号：NOG］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Urine Cell-Free Circulating and Viral Nucleic Acid Purification Mini Kit	59900	50 preps	¥101,000	室
Urine Cell-Free Circulating and Viral Nucleic Acid Purification Midi Kit	60000	20 preps	¥94,000	室
Urine Cell-Free Circulating and Viral Nucleic Acid Purification Maxi Kit	60100	10 preps	¥52,000	室

cf-DNA/cf-RNA 精製 ▶▶▶ cf-DNA/cf-RNA　　WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 39799

血漿中 cf-DNA / cf-RNA 保存チューブ

NORGEN BIOTEK CORP.

cf-DNA / cf-RNA を室温で 30 日間保存

セルフリー DNA、セルフリー RNA、循環腫瘍細胞（Circulating Tumor Cell：CTC）解析用に、全血を保存するためのチューブです。

使用例

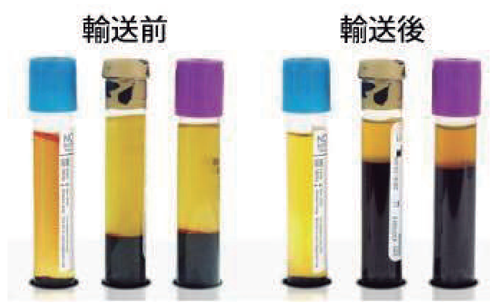


図　輸送前後のチューブの様子
Norgen 社チューブ（左）、他社チューブ（中）、EDTA チューブ（右）に 6 人のドナーから採取した全血を保存した。
3 本は室温で保管し、残りは断熱容器を用いて空輸した（72 時間）。Norgen 社チューブでは、他社チューブや EDTA チューブを用いた場合と比較し、十分な血漿量を確保できた（6 ～ 7 mL）。

チューブサイズ	16 × 100 mm
材質	PET
採血量	8.4 mL（10 mL チューブ）
回収可能な血漿量	6 ～ 7 mL
保存剤	非ホルムアルデヒド
保存期間	cf-DNA：室温で 30 日間 cf-RNA：室温で 30 日間 循環腫瘍細胞（CTC）：室温で 14 日間

［Norgen Biotek Corp.　　メーカー略号：NOG］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
cf-DNA/cf-RNA Preservative Tubes	63950	50 tubes	¥115,000	室

SeleCTEV™ DNA Enrichment Kit（がん研究）

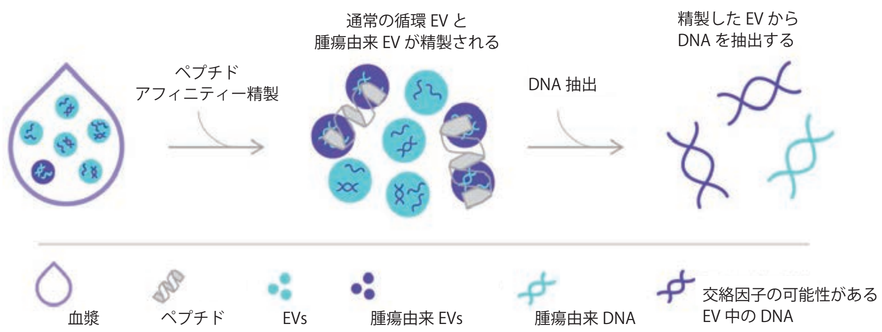
Hansa BioMed

ヒト生体液からのセルフリー DNA（cfDNA）と腫瘍由来の細胞小胞（EV）中の DNA の精製に

ヒト血漿／血清／尿から循環遊離 DNA（cfDNA）と腫瘍由来の細胞外小胞（EV）中の DNA を選択的に精製するキットです。
エクソソームの分離は独自のペプチドアフィニティ法に基づいています。

アプリケーション

- ●腫瘍由来の EV および循環 DNA（cfDNA）の分析前精製に
- ●デジタル PCR（dPCR）による突然変異の検出に適した DNA を単離できる
- ●精製された DNA は dPCR、qPCR、NGS に適用する



本キットで精製した腫瘍由来 DNA（EV 由来 & cfDNA）の解析例

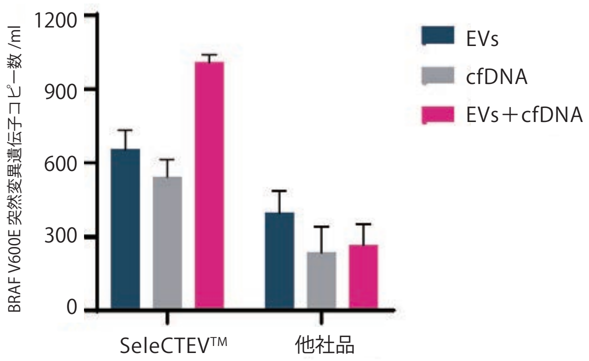


図 1　キットで精製した腫瘍由来 DNA からの突然変異の検出
突然変異遺伝子を持つ EV と cfDNA を、単独または一緒に健康なドナー血漿にスパイクし、SeleCTEV™ または他社品を用い、DNA を精製した。SeleCTEV™ は他社品よりも突然変異遺伝子のある EV と cfDNA の両方を精製することができ、他社品よりも EV と cfDNA を分離する効率的な方法であるとわかった。

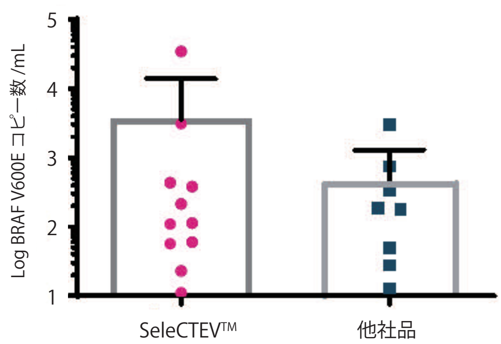


図 2　転移性黒色腫患者の腫瘍由来 DNA 解析
組織生検検査として、BRAF V600E 陽性腫瘍を有する 20 人の患者と野生型（WT）転移性黒色腫を有する 30 人の患者から血漿サンプルを採取した。BRAV V600E および BRAF WT のコピーを、デジタル PCR によって検出した。本キットで精製した腫瘍由来 DNA からは BRAF V600E 遺伝子コピーが 11 人で検出され、他社品で精製した場合には 8 人でしか検出されなかった（変異体コホートの血漿サンプルを使用）。

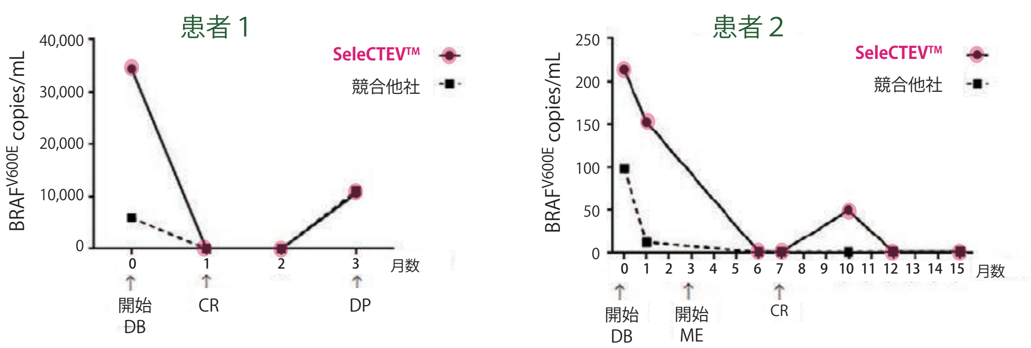


図 3　SeleCTEV™ と他社キットを用い、BRAF 阻害剤で治療された MM 患者の血漿中のセルフリー DNA（cfDNA）と腫瘍由来の細胞小胞（EV）中の DNA を抽出し、BRAFV600E レベルをモニタリングした。患者 1 では、環 BRAFV600E レベルのリバウンドと予後不良が確認でき、3 ヵ月以内に疾患が進行（DP）した。患者 2 では、確認する期間内では疾患進行の証拠は観察されず、血漿中の変異遺伝子コピーは低いままか検出不可能なままであった。

［HansaBioMed OU　　メーカー略号：HNB］

品名／構成内容	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
SeleCTEV：Tumor DNA enrichment kit	HBM-EXS-DNA	1 kit	￥154,000	冷

●抽出試薬　●再懸濁バッファー　●10X 分離バッファー　●分離チューブ　●プロテイナーゼ K　●溶解バッファー
●洗浄バッファー 1　●洗浄バッファー 2　●溶出バッファー　●DNA 精製カラム　●溶出チューブ

その他 ▶▶▶ ライブラリ調製
WEB 記事ID検索 ▶▶▶ 12977

NEXTflex™ Cell Free DNA-Seq Kit 2.0

PerkinElmer For the Better

次世代シーケンシング｜セルフリー DNA ライブラリ調製キット（Illumina 社対応）

Illumina 社次世代シーケンサー（NGS）に対応するセルフリー DNA ライブラリ調製キットです。わずか 10 ng の血液循環腫瘍 DNA（circulating tumor DNA；ctDNA）または血液循環胎児 DNA（cell free fetal DNA；cffDNA）からライブラリの調製が可能で、少量のインプット DNA 量で、高いカバレッジとバイアスの低減を実現します。

特長

- ●少ないインプット DNA 量：最低必要量わずか 10 ng
- ●2 時間以内の簡便操作・迅速プロトコール
- ●独自のアダプターライゲーション技術（"Enhanced Adapter Ligation Technology"）によってより大きなリード数を実現
- ●フレキシブルなアダプターバーコード：独自の 384 バーコード
- ●Illumina® シーケンシングプラットフォームに対応

2 時間以内のライブラリ調製

Illumina® プラットフォームでご利用可能なシングルまたはペアエンド、マルチプレックス DNA ライブラリ調製にご使用いただけます。ワンステップのエンドリペア、アデニル化プロトコールによって、迅速なライブラリ調製が可能です。さらに、独自の 384 種のバーコードは、アプリケーションのハイスループット化にご利用いただけます。

バイアスとカバレッジギャップの低減

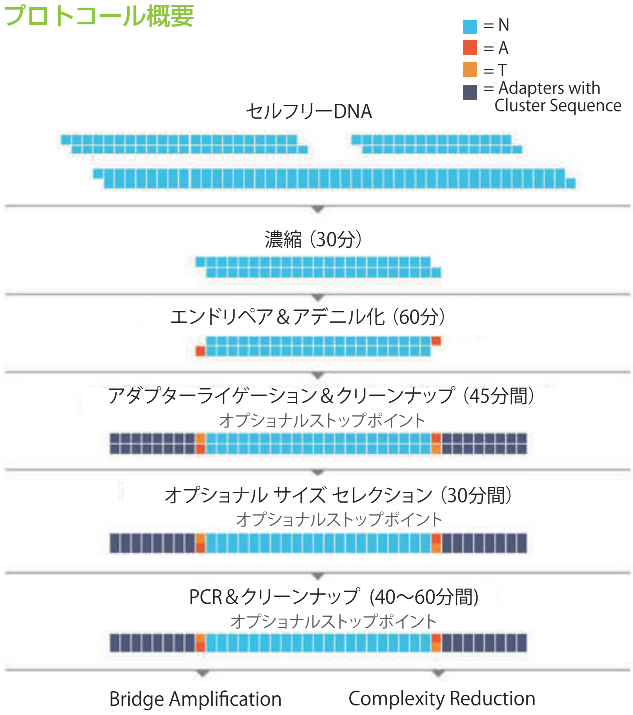
高い正確性の NEXTflex™ PCR ポリメラーゼ酵素が含まれ、サンプルの GC バイアスを最小限に抑え、シーケンスの困難なゲノム領域に対しても均一なカバレッジを実現します。本商品は株式会社パーキンエルマージャパン独自の "Enhanced Adapter Ligation Technology" を利用しており、最大のライゲーション効率を実現し、多様なライブラリ調製とより大きいリード数を得られます。これらの最適化技術によって、1 回のシーケンシング解析におけるより多くの情報取得を可能にします。

フレキシブルなマルチプレックスオプション

マルチプレックスでご使用いただく場合、NEXTflex™ DNA Barcodes ※1 および NEXTflex-96™ DNA barcodes ※1 と併せてご使用いただけます。6、12、24、48、96、384 種類の独自のアダプターを利用可能です。また、NEXTflex Dual-Indexed DNA バーコードは、最大で 192 サンプルのマルチプレックス解析が可能です。

※1　関連商品でご紹介

プロトコール概要



構成内容

- ●cfDNA エンリッチメント ビーズ
- ●エンドリペア & アデニル化酵素バッファーミックス 2.0
- ●エンドリペア & アデニル化酵素ミックス 2.0
- ●リガーゼ酵素ミックス 2.0
- ●PCR マスターミックス 2.0
- ●プライマーミックス 2.0
- ●Nuclease-free 水
- ●Resuspension バッファー
- ●洗浄ビーズ 2.0

<その他で必要な試薬・機械>

- ●10 ng of cell free DNA in up to 32 μL nuclease-free water.
- ●NEXTflex® Unique Dual Index Barcodes（品番：NOVA-514150、NOVA-514151）
- ●NEXTprep-Mag™ cfDNA Isolation Kit または NEXTprep-Mag™ Urine cfDNA Isolation Kit ※2
- ●100% エタノール、80% エタノール
- ●96 ウェル PCR プレート（ノンスカート）（Phenix Research、品番：MPS-499 or similar）
- ●96 ウェルプレート（ライブラリ保存用）（Fisher Scientific、品番：AB-0765 or similar）
- ●PCR プレートシール（BioRad、品番：MSB1001）
- ●PCR反応産物精製キット - Agencourt AMPure XP 60 mL（Beckman Coulter Genomics、品番：A63880）
- ●磁気スタンド -96（Ambion、品番：AM10027 or similar）
- ●サーマルサイクラー
- ●2、10、20、200、1,000 μL ピペット／マルチチャネルピペット、ピペットチップ
- ●Nuclease-free バリア ピペットチップ

※2　関連商品、およびコスモ・バイオの Web で紹介しています。

WEB 記事ID 14920、16709 検索

［株式会社パーキンエルマージャパン　メーカー略号：PEJ］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
NEXTflex® Cell Free DNA-Seq Kit 2.0	NOVA-5150-01	8 rxns	¥69,000	室 凍
	NOVA-5150-02	48 rxns	¥308,000	室 凍

■関連商品　NEXTflex™ DNA バーコード

［株式会社パーキンエルマージャパン　メーカー略号：PEJ］

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
NEXTFLEX® Unique Dual Index Barcodes - 1 - 96 (in 96-well plate)	NOVA-514150	192 rxns	ご照会	凍
NEXTFLEX®# Unique Dual Index Barcodes - 97 - 192 (in 96-well plate)	NOVA-514151	192 rxns	ご照会	凍

■関連商品　cfDNA抽出キット

［株式会社パーキンエルマージャパン　メーカー略号：PEJ］

品名	Web の記事 ID	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
NEXTprep-Mag™ cfDNA Isolation Kit（1-3 mL plasma samples）	14920	NOVA-3825-01	1 kit	¥93,000	室 凍
NEXTprep-Mag™ cfDNA Isolation Kit（3-5 mL plasma samples）		NOVA-3825-03	1 kit	¥175,000	室 凍
NEXTprep-Mag™ Urine cfDNA Isolation Kit（< 1 mL - 4 mL）	16709	NOVA-3826-01	1 kit	¥35,000	室 凍
NEXTprep-Mag™ Urine cfDNA Isolation Kit（4 mL - 20 mL）		NOVA-3826-02	1 kit	¥47,000	室 凍

その他 ▶▶▶ がん研究用　　WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 41757

evGAG Extracellular vesicles Purification Kit

Hansa BioMed

細胞外小胞・エクソソームの簡便な単離に

　本商品は、「evGAG」という、生体液（血清、血漿ならびに尿）から細胞外小胞（EV）を分離する特許取得済みの精製方法を用いています。evGAG反応は、沈殿溶液と EV 内のグリコサミノグリカン（GAG）との相互作用に基づいています。この商品は、EV関連のバイオマーカーの発見に最適です。
　精製した細胞外小胞は、核酸抽出（→シーケンス解析）や、ウエスタンブロットやフローサイトメトリーによるタンパク質解析に使用できます（電子顕微鏡観察や、機能解析には適していません）。

特長

- ●迅速かつシンプルなプロセス（細胞外小胞回収まで 20 分）
- ●サンプル必要量　0.5 ～ 2 mL
- ●超遠心分離機不要、卓上遠心分離機で使用可能

背景

　Glypican-1 等のグリコサミノグリカンががん由来のエクソソームに高発現しており、リキッドバイオプシーにおけるがん研究に用いることができます。

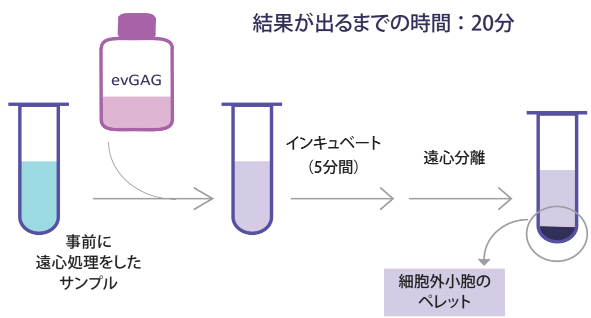


図 1　作業工程

使用例①　evGAG による尿サンプルの細胞外小胞分離

　尿サンプルを evGAG で精製しました。健康なドナー（UHD）からの尿 1 mL と、KRASG13D の突然変異を持つ結腸がん細胞株（品番 ： EXO-REF-KRAS-G13D-2）からの細胞外小胞をスパイクインさせた健康なドナーからの尿 1 mL を、それぞれ 2 mL の evGAG とともに 5 分間インキュベートさせ、3,000 *g* で 15 分間遠心分離を行いました。これにより、EV を含む沈殿ペレットが得られ、他社品との比較に用いました。

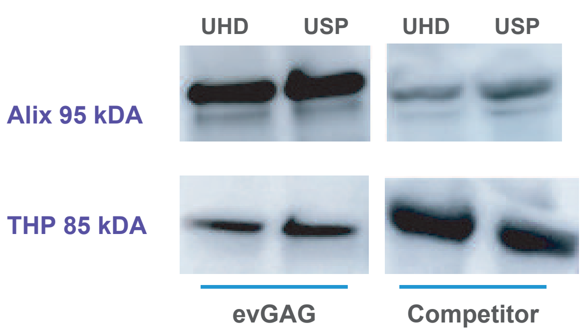


図 2　細胞外小胞マーカーである Alix のウエスタンブロット解析では、evGAG で分離した細胞外小胞の濃度が他社試薬で分離した場合に比べて高いことが確認された。一方、特異的な標的ではないウロモデュリン（THP）は、evGAG で分離された細胞外小胞では他社試薬で分離した場合に比べて濃度が低かった。

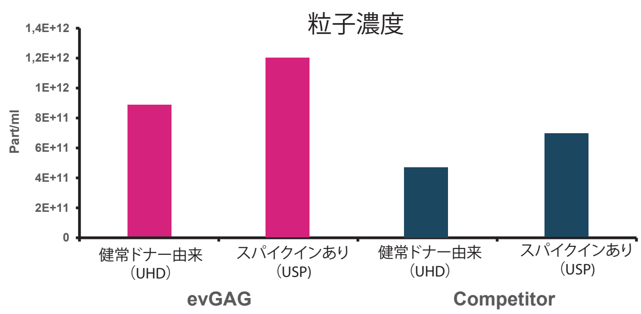


図 3　細胞外小胞を含むペレットを PBS に再懸濁し、ナノ粒子追跡分析（NTA）で分析した。健常ドナー由来（UHD）、および健康なドナーに KRASG13D 変異を有する大腸がん細胞株から精製した細胞外小胞をスパイクインしたもの（USP）の両サンプルにおいて、本商品を用いて分離した細胞外小胞（それぞれ 8.8 × 10^{11} および 1.2 × 10^{12}）では他社試薬を用いて分離した細胞外小胞（それぞれ 4.6 × 10^{11} および 6.9 × 10^{11}）と比較して、ナノ粒子濃度が 2 倍であった。

次のページへ続く

機能解析
タンパク質/RNA/DNA抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs産生
EVs精製
エクソソームマーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/cf-RNA精製
その他
受託サービス

使用例② evGAGで精製したエクソソームのナノ粒子トラッキング解析

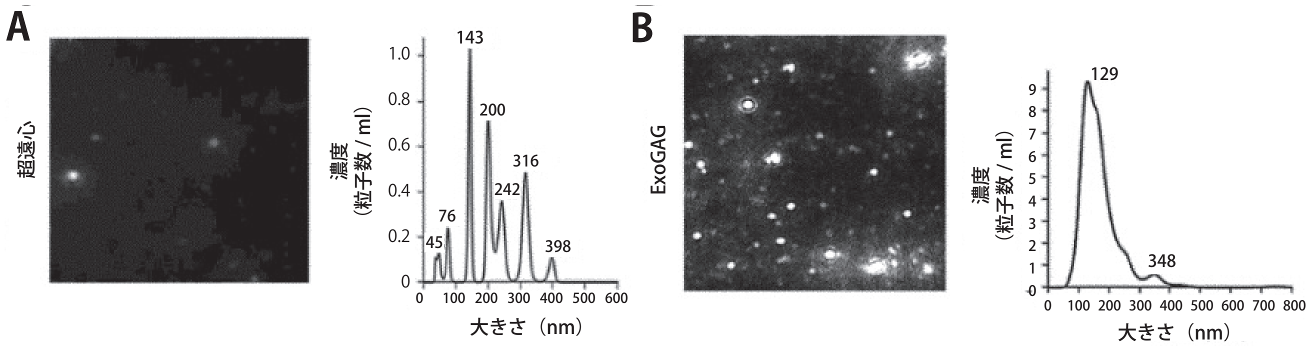


図4 尿から分離したEVのナノ粒子追跡分析（NTA）画像
粒子サイズ（nm）および濃度（粒子/mL）を示す。
(A) 超遠心分離で分離されたEV
(B) evGAGによって分離されたEV

使用例③ evGAGを使用して50 µLの血漿または血清および3 mLの尿から単離されたEVのサイトメトリー分析

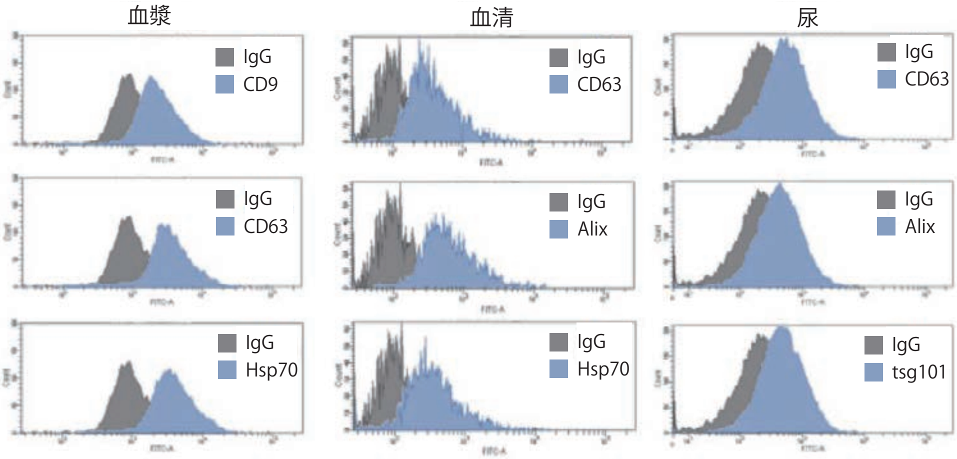


図5 使用した一次抗体：抗CD9（品番：HBM-CD9-100）、抗CD63（品番：HBM-CD63-100）、抗ALIX（品番：HBM-ALIX-100）、抗TSG101（品番：HBM-TSG101-100）、抗HSP70（品番：HBM-HSP70-100）、HansaBioMed Life Sciencesによって製造され、ガイドに従って使用した。

参考文献

Extracellular Vesicles-Based Biomarkers Represent a Promising Liquid Biopsy in Endometrial Cancer Carolina Herrero *et al*. Cancers (Basel). 2019 Dec 12;11(12):2000.
doi: 10.3390/cancers11122000.

［HansaBioMed OU　メーカー略号：HNB］

品名／構成内容	適用サンプル	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
evGAG Extracellular Vesicles Purification Kit ●evGAG（liquid）	ヒト血漿、血清、尿	HBM-EXS-GAG	1 kit (20 reactions)	¥200,000	室

受託サービス関連 ▸▸▸　　記事 ID 検索 ▸▸▸ 34759

エクソソームのプロテオーム解析受託サービス

Hakarel

［株式会社ハカレル　　メーカー略号：HAK］

微量タンパク質まで網羅的に定量・同定可能！

DIA プロテオーム解析では、最新鋭の質量分析計である Q-Exactive HF-X（Thermo Fisher Scientific 社）を用いて分析深度と定量性に定評のある Data-independent acquisition（DIA）分析法でプロテオーム解析を実施します。

一度の分析で最大 8,000 種類のタンパク質を観測し、サンプル間で個々のタンパク質の量的比較を行うことが可能です。

また、当受託サービスはサンプル前処理から DIA プロテオーム解析までを一貫して行うワンストップサービスですので、サンプルを送付するだけでデータが手に入ります。

当受託サービスの DIA プロテオーム解析システムでは、ヒト由来の培養細胞である HEK293 細胞において 8,000 以上のタンパク質を観測し（かずさ DNA 研究所での未公開データ）、3,000 程度のタンパク質が観測される一般的なプロテオーム解析結果と比較すると、キナーゼと転写因子の観測数はともに 4 倍以上に増加しています（試料によって観測できるタンパク質数は異なりますのでご注意ください）。高発現量のタンパク質から今まで観測が難しかった微量タンパク質までを網羅的に解析することができます。

図　Q-Exactive HF-X（Thermo Fisher Scientific 社）

サービスメニュー

品番	メニュー	試験内容	最良結果を得るためのサンプル必要量	納期
EP-1	**サンプルからのエクソソーム調製**	超遠心法によるエクソソーム調製	細胞培養上清：無血清培地で 100 mL 血清・血漿：0.5 mL	都度相談
MS-1	**簡易 DIA プロテオーム解析による タンパク質発現・相対定量解析**	LC-MS/MS（DIA）により、 2,000 ～ 4,000 種類の タンパク質の同定と相対定量解析	タンパク量として 5 μg 以上	4 週間
MS-2	**DIA プロテオーム解析による タンパク質発現・相対定量解析**	LC-MS/MS（DIA）により、 4,000 ～ 6,000 種類の タンパク質の同定と相対定量解析	タンパク量として 5 μg 以上	4 週間
MS-3	**高深度 DIA プロテオーム解析による タンパク質発現・相対定量解析**	Gas phase fraction 法により 大規模なプロテイン・ペプチド ライブラリを作製し、 そのライブラリをもとに 6,000 ～ 8,000 種類のタンパク質の 同定ならびに相対定量解析	タンパク量として 10 μg 以上	4 週間
MS-4	**オプション**：サンプルクリーンアップ処理 （サンプルがすでに何かの抽出液で溶解されている場合は サンプルクリーンアップ処理を強く薦めます）			※
MS-5	**オプション**：繰り返し測定 （通常は 1 サンプルに対して 1 測定）			※

※オプションを加えても納期に影響なし

■お見積もり・お問い合わせ先

各サービスは、コスモ・バイオの Web より、お見積もりのご依頼を受け付けています。専用フォームにあるお見積もりに必要な情報をご記入いただき、下記までお問い合わせください。秘密保持契約などにつきましても、ご対応いたします。

創薬・受託サービス部　　TEL：03-5632-9615　E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

受託サービス関連 ▶▶▶

WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 33762

エクソソーム検出ツール作製受託サービス

Hakarel

［株式会社ハカレル　　メーカー略号：HAK］

エクソソーム検出法の研究サポートを中心に、組換えタンパク質の作製、モノクローナル抗体の作製、ELISA 測定系の構築、エクソソーム ELISA 測定等をトータルサポートします。

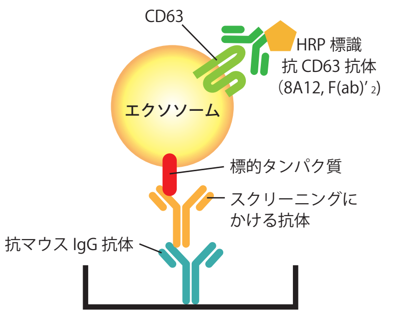
サービス内容

① 組換えタンパク質の作製

エクソソーム表面マーカーの抗体を取るための免疫源としてのタンパク質を動物細胞で発現・精製します。技術的には、抗原タンパク質と抗体の Fc 領域との融合タンパク質を設計し動物細胞から分泌させて精製いたします。また、ELISA 構築サービスのオプションとして、標準物質としての融合タンパク質（2 種類の抗体のエピトープをタンデムに連結させた組換えタンパク質）の受託合成も実施します。

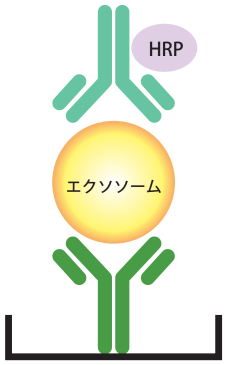
② エクソソーム表面マーカーに対するモノクローナル抗体作製

標的タンパク質および CD63 を発現しているエクソソームを用いて、エクソソーム表面上に存在する標的タンパク質の 3 次元構造を認識する抗体を選択します。高性能な抗 CD63 抗体（クローン：8A12）を F(ab)'$_2$ 化することにより、高い S/N 比を実現します。



③ ELISA 測定系の構築

●抗テトラスパニン抗体でエクソソームを捕捉
●エクソソーム表面抗原に対する標識抗体でサンドイッチ
●標識抗体のカスタム調製（市販抗体でも OK）
●独自技術による標準試薬の作製



④ エクソソーム ELISA 測定

サンプル中のエクソソームをヒト由来エクソソーム定量用 CD9/CD9、CD63/CD63、CD81/CD81 ELISA（77 ページでご紹介）で定量します。

標準価格

品番	商品	サービス内容	標準価格（税別）	備考
PS-1	組換えタンパク質作製	ご希望のタンパク質を動物細胞で発現させ、精製まで	¥800,000 ～	精製タンパク質 1.5 mg
MA-1	抗体作製	（1）免疫（マウス 1 系統 3 匹）	¥300,000 ～	抗原タンパク質はカスタマーがご用意。マウスに免疫し、抗体価の確認まで。
MA-2		（2）細胞融合し、エクソソームなどを用いたスクリーニング	¥700,000 ～	
MA-3		（3）精製抗体とハイブリドーマ（3 クローンまで）納品	¥500,000 ～	
MA-4		（4）抗体の大量調製	¥100,000（1 mg あたり）	
CE-1	ELISA 構築	（1）エクソソームを挟み込むサンドイッチ ELISA 作製	¥300,000 ～（条件設定とプレート 1 枚分納品）	任意の抗体を標識。固相（抗 CD9）抗体と組み合わせ。標準試薬はカスタマーがご用意。
CE-2		（2）追加キット	¥100,000（プレート 1 枚分あたり）	
QE-1	ELISA 測定	CD9/CD9、CD63/CD63、CD81/CD81 ELISA（コスモ・バイオ製）の受託測定	¥250,000（プレート 1 枚分あたり）	
QE-2			¥8,000（プレート 1 枚分あたり）	

■お見積もり・お問い合わせ先

各サービスは、コスモ・バイオの Web より、お見積もりのご依頼を受け付けています。専用フォームにあるお見積もりに必要な情報をご記入いただき、下記までお問い合わせください。秘密保持契約などにつきましても、ご対応いたします。

創薬・受託サービス部　TEL：03-5632-9615　E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 41850

フローサイトメトリー（FACS）受託解析サービス

RayBiotech Empowering your proteomics

［RayBiotech, Inc.　　メーカー略号：RBT］

細胞およびシグナル伝達の表現型、細胞増殖の変化、サイトカイン産生、細胞分裂、さらには細胞内シグナル伝達イベントを評価するためのフローサイトメトリー受託解析サービスをご提供しています。エクソソームサンプルにもご対応可能です。

RayBiotech 社では、GLP 適合施設での測定も行うことができ、測定系のバリデーションから、検体測定までをワンストップで実施可能です。

対応可能な試験内容：

免疫表現型	細胞毒性
タンパク質のリン酸化	アポトーシス
細胞内および細胞表現抗原	細胞の活性化
細胞増殖	セルソーティング

主な使用機器	BD FACScelesta
対応サンプル	血液、PBMC、培養細胞、エクソソーム等

エクソソームサンプルの解析例

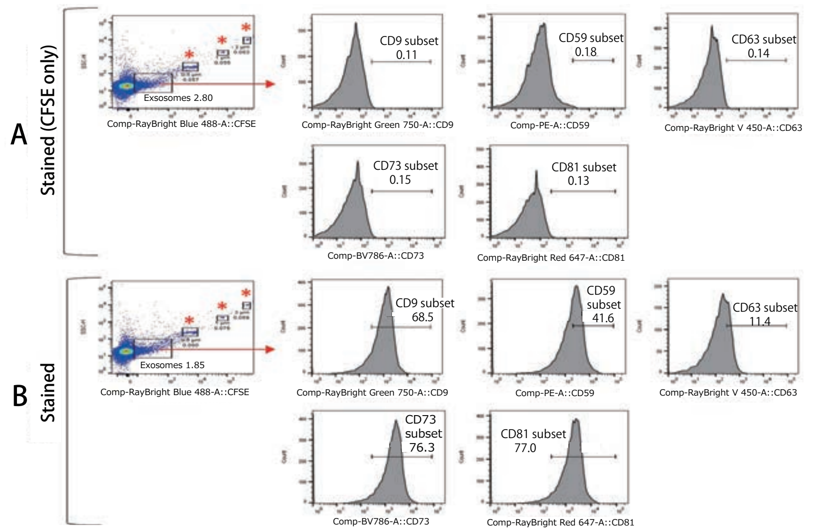


図　エクソソームのフローサイトメトリー解析
カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CFSE）で標識したエクソソームをエクソソームマーカーに対する各種マーカーで染色し、解析した。
サンプル：ヒト臍帯血から単離したエクソソーム
使用マーカー：CD9、CD59、CD63、CD73、CD81
A）CFSE※のみで染色
B）CFSE および CD9、CD59、CD63、CD73、および CD81 を標的とする蛍光標識抗体で染色
※CFSE は、細胞内アミン化合物に結合する細胞透過性色素です。エクソソームとバックグラウンドノイズを区別するために使用されます。

選択可能なフローサイトメトリー蛍光色素の一覧

RayBright® 蛍光色素	Exitation Laser	Max Exitation/ Emission	同等の蛍光色素
RayBright® UV 450	UV 355	347/448 nm	Alexa Fluor 350
RayBright® Violet 450	Violet 407	403/454 nm	Pacific Blue, Alexa Fluor 450
RayBright® Violet 500		405/537 nm	Alexa Fluor 430, BV510
RayBright® Violet 600		407/600 nm	BD Brilliant Violet 605
RayBright® Violet 655		407/655 nm	BD Brilliant Violet 655
RayBright® Blue 488	Blue 488	491/518 nm	Alexa Fluor 488, FITC, BD BB515
RayBright® Blue/Green 575	Blue 488/Green 561	505/570, 553/570 nm	R-PE, Cy3
RayBright® Green 594	Green 561	594/614 nm	PE-Texas Red, PE-CF594, PE-eFluor610
RayBright® Blue/Green 647（PE-tandem dye）	Blue 488/Green 561	496/664, 565/664 nm	PE-Cy5
RayBright® Blue/Green 780（PE-tandem dye）	Blue 488/Green 561	496/780, 565/780 nm	PE-Cy7, PE-Alexa Fluor 750
RayBright® Red 647	Red 640	649/664 nm	APC, Alexa Fluor 647, Cy5
RayBright® Red 700		685/710 nm	Alexa Fluor 700, APC-R700
RayBright® Red 780		629/780 nm	Alexa Fluor 750, APC-eFluor 780

次のページへ続く

伝統的な蛍光色素	Exitation Laser	Max Exitation/ Emission
PerCP	Blue 488	482/667 nm
R-PE	Blue 488/Green 561	496/780, 565/780 nm
APC	Red 640	651/662 nm

■お見積もり・お問い合わせ先

各サービスを紹介するコスモ・バイオの Web より、お見積もりのご依頼を受け付けています。専用フォームにあるお見積もりに必要な情報をご記入いただき、下記までお問い合わせください。秘密保持契約などにつきましても、ご対応いたします。

創薬・受託サービス部　　TEL : 03-5632-9615　E-mail : jutaku_gr@cosmobio.co.jp

受託サービス関連 ▶▶▶　　WEB 記事 ID 検索 ▶▶▶ 17766

クライオ電子顕微鏡を用いたエクソソーム等の観察受託サービス

Terabase

［テラベース株式会社　　メーカー略号：TRB］

エクソソーム等の微細構造を透過電子顕微鏡を用いて観察する受託サービス

本サービスでは、エクソソーム・リポソーム等のソフトマテリアルをクライオ透過電子顕微鏡で観察します。

特長

●従来の包埋・染色・切片加工にかわり、迅速・より生に近い観察が可能です。

●最近話題のリポソーム、エクソソームの観察に威力を発揮しています。

内容

溶液をそのまま凍結し、透過電子顕微鏡にて観察を行います。試料や観察目的により最適な観察法を組み合わせ、より生に近い状態で微細構造を観察します。

お預かりした溶液をそのまま急速凍結して観察します。溶液状態を反映した画像が得られます。無染色・構造破壊が少ない状態で観察できます。小胞体の二重膜、多層膜が確認できます。

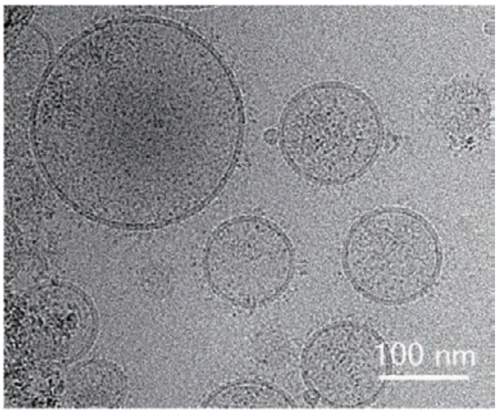
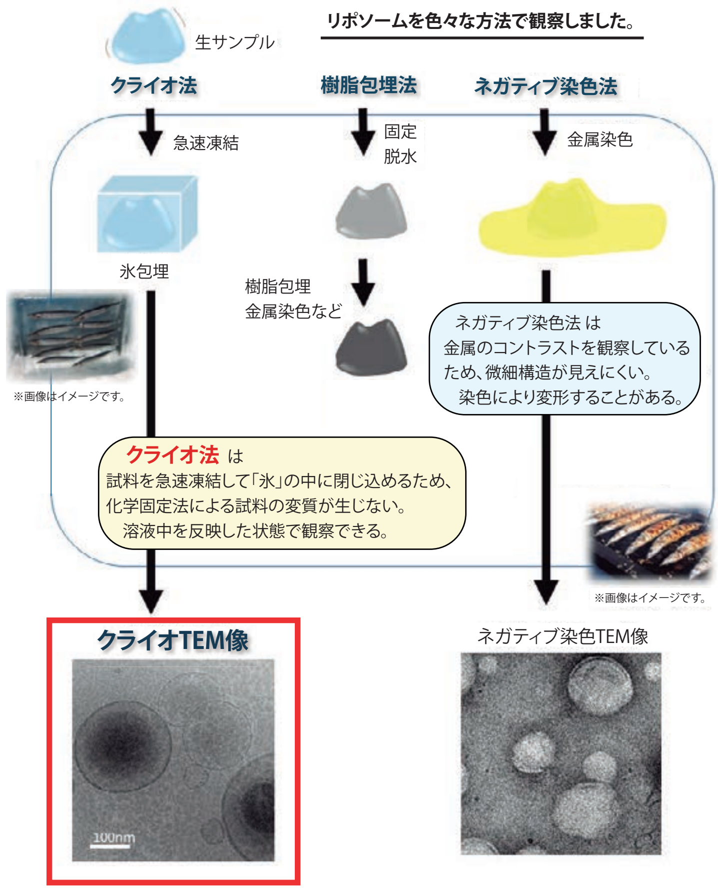


図　クライオ法による乳がん細胞株由来エクソソームの観察
（国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野様　ご提供サンプル）

透過子顕微鏡（TEM）観察例　試料作製、観察法による違い



ご参考価格

■ 1 検体あたりの税別参考価格

アカデミック User：約 45 万円
（リポソームおよびエクソソーム観察に限り、数量ディスカウントがあります）

コマーシャル User：約 75 万円
（企業様との共同研究などで成果占有が必須となる場合は企業様向けの価格となります）

納期：検体受領後約 3 ～ 5 週間（検体数、時期により変動します）

■ご注文・お見積もり方法

本サービスを紹介するコスモ・バイオの Web からお見積もりをご依頼いただけます。

ホームページの「記事 ID 検索」欄からご検索ください。

WEB 記事ID 17766 検索

技術情報 非イオン性、等浸透圧勾配による密度勾配遠心

— OptiPrep™の使い方 —

多用途密度勾配遠心分離媒である OptiPrep™ は本誌 44 ページで紹介しています。

1. はじめに

エクソソームは、細胞間コミュニケーションのメディエーターとして重要な役割を果たしており、様々なヒトの悪性腫瘍（脳腫瘍、結腸直腸がん、白血病など）の発症にも関連しています。腫瘍細胞のエクソソームに含まれる診断用バイオマーカー (miRNA など) は、特定のがん性状態の予測に役立ち、ワクチンや薬剤の標的を絞った送達にも役立つと考えられています。そのため、OptiPrep™ においては、体液からの膜小胞の精製が最も急速に拡大している用途の 1 つになっています。

2. グラジエント作成前の準備（細胞培養したサンプルの場合）

エクソソームを精製するサンプルは、一般に細胞培養からの液体培地であるため、培地にエクソソームの不純物となる粒子が含まれていないか確認することが重要です。そのため、事前に超遠心分離やろ過をします。細胞培養後には、まず細胞そのものやその他の大きな粒子を遠心分離によって馴化培地から除去します。1 回の低速遠心分離で次に進めてしまう時もありますが、多くの場合は 2 または 3 ステップ (例：300 *g* と 5,000 *g*、または 300 *g*、1,000 *g*、3,000 *g*) で、通常 10 ～ 15 分間遠心分離します。これらの最初のステップを省略すると、高い重力で急速に沈降する大きな粒子の凝集体に、小さな小胞が閉じ込められてしまう可能性があります。ろ過は、より大きな汚染物質を除去するためにも使用されます。これは通常、0.2 または 0.22 µm のシリンジフィルターを使用して実行されますが、より小さな孔 (0.1 µm) またはより大きな孔 (0.45 µm) を使用する場合もあります。ろ過は通常、遠心分離と組み合わせますが、前処理がろ過のみの場合もあります。

エクソソームは精製のために 100 ～ 150,000 *g* で 1 ～ 2 時間かけてペレット化し、緩衝液に再懸濁する必要があります。 Duelli らは、馴化培地を最初に 500 *g* で遠心分離し、ろ過した後、12,000 *g*、70,000 *g*、110,000 *g* で連続的に遠心分離する方法を紹介しています [1]。エクソソームの融合活性（exosomal fusogenic activity）は 70,000 *g* で得たペレットに高度に存在していましたが、110,000 *g* で得たペレットにはほとんど存在していませんでした。前者はイオジキサノール密度勾配でさらに精製されました。一部のプロトコール、特に大量の馴化培地が適用されるプロトコールでは、100 ～ 150,000 *g* で最終ペレット化する前に、予備濃縮として遠心限外ろ過で総量を減らします（限外フィルターのカットオフは 5 kDa ～ 100 kDa)。こうすることで、大きなローターの使用が回避されます。

3. イオジキサノール勾配の分類

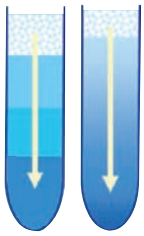
【方法 1】 イオジキサノール勾配でトップロードする場合、通常は 1.5 ～ 2 時間遠心分離する。多くの場合、複数の層（不連続）から勾配が構成されるが、わずか 1.2% (w/v) イオジキサノールの密度間隔は非常に小さいため、6 ～ 18% (w/v) イオジキサノール勾配は本質的に連続的である。

【方法 2】 遠心分離時間 2 ～ 3 時間のボトムロードまたはトップロードで、不連続グラジエントを使用する。

【方法 3】 ボトムロードまたはトップロードしての連続勾配で遠心分離する。通常 100 ～ 200,000 *g* で 16 ～ 21 時間（長時間）遠心分離する。【方法 2】を含め、小胞は浮力密度に従って縞模様になる。

【方法 4】 自己密度勾配形成（Self-generated gradients）：通常、垂直または垂直に近いローターで約 350,000 *g* で 2 ～ 3 時間遠心分離する。この方法には、他の自己密度勾配形成と同様、セットアップが簡単であり、密度の再現性が非常に高くなるという利点がある。

エクソソーム精製のためのイオジキサノール勾配

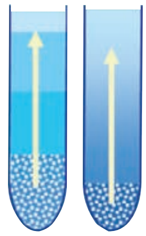


トップロードの連続または不連続勾配

欠点：すべての粒子が同じ方向に移動する。 あらゆる界面（特にサンプル / 勾配界面）で粒子が凝集する可能性がある。 連続勾配の場合は、より高い分解能となるが、粒子のバンドはあまり鮮明ではない。連続勾配は沈降速度分離に使用できる。

ボトムロードの連続または不連続勾配

理想的には、最も密度の高い粒子がロードした場所（下部、または堆積物）に残る。密度が最も低く、最大でもある粒子が最も速く浮遊する。 多くの場合、トップロード形式よりもバンドの解像度が優れる。



中間にロードする不連続勾配

浮力密度で分離する。粒子はロードした場所に留まるか、浮遊あるいは沈降する。

自己密度勾配形成、遠心分離中に勾配が形成される方法

約 300,000 *g* の遠心分離で連続グラジエントが生成される。垂直または垂直に近いローターを用いる。

イオジキサノール勾配を使用してエクソソームを分析した細胞、組織、ウイルスのリスト(アルファベット順)

A: AAV-associated, Amoeboid cancer cells, Arabidopsis, Astrocytes, Astrocytoma cells, Atlantic salmon kidney
B: Bone marrow mast cells, Bone marrow mesenchymal stromal, Brain cortex, Brain tumour, Breast cancer cells
C: Carcinoma cells (colorectal, prostate), Cardiac progenitor cells, Cerebrospinal fluid, Chicken blood, Chinook salmon embryo, Cytomegalovirus
D: Daudi cells, Dendritic cells, Dengue virus transmission, Dermal fibroblasts, Drosophila
E: Ebola virus VP40 infected cells, Embryonic stem cells, Endometrial stromal cells, Endothelial cells, Endothelial progenitor cells, Epididyosomes, Erythrocytes (Plasmodium-infected) Erythroleukaemic cells, Erythrocytes (equine anaemia), Extravillous trophoblast cells, Eye diseases
F: Fibrosarcoma cells, Flavivirus transmission
G: Gastrointestinal cancers, Ginger root, Glioblastoma cells, Glomerular mesenchymal stromal cells
H: HEK cells, HeLa cells, HEp-2 cells, Hepatocytes, Hepatoma cells, Hepatic cells, Hepatitis A, B and C virus-associated cells, Herpes simplex virus infected cells, HIV infected cells, HTLV infected cells, Human $CD4^+$ T cells, Human carcinoma cells, Human kidney epithelial, Human liver stem cells, Human lung carcinoma cells Human lung fibroblast (MRC-5), Human mast cells, Human myelomonocytic cells, Human saliva, Human sperm, Human trophoblast, HUVEC derived, Hypothalamus cells
I: IL-15 cell priming, Induced pluripotent stem cells, Insects, Intestinal epithelial cells
J: Jurkat cells
K: Keratinocytes, Kidney (primary embryonic and proximal tubule cells), Kirsten rat sarcoma cells
L: Leukaemia derived, Liver fibrosis, Lung cancer, Lymphoblastoid cells, Lymphocytic/leukaemia cells
M: Macrophages, Mammary epithelial cells, Mast cells, MCF-7 cells, MDCK cells, Medulloblastoma, Melanocytic cells, Melanoma cells, Mesenchymal stem cells, Mesenchymal stromal cells, Metastatic cancer, Milk, MIN6 (insulinoma) cells, Monocytes, Macrophages; Multiple myeloma bone disease, Murine lung, Mouse embryo fibroblasts, Myeloma cells, Multivesicular bodies
N: NCI60 cancer cells, NK cells, Neuroblastoma cells, Neural tumours, Neuronal cells, Neutrophils (human)
O: Oncosomes. Osteoclasts, Osteosarcoma cells
P: Pancreatic carcinoma cells, Pancreatic beta cells, Papilloma virus, Pheochromocytoma cells, Placenta-derived, Plasma, Platelets, Prostate cancer cells

R: Rat1 cells, Renal carcinoma, Renal tubule cell, Retinal pigmented epithelial
S: Salivary. Schistosoma mansoni, Seminal fluid, Sheep hyatid cysts, Skeletal muscle cells, Spinal cord, Suprachiasmatic nuclei cells, Synovial fibroblasts and fluid
T: T cells, Thyroid cancer cells, Tissue factor-containing, Trabecular meshwork cells, Trophoblasts, Tumour epithelial cells
U: U937 cells, Urinary
V: VSV infected cells
Z: Zebra-fish, Zika virus

参考文献

（1）Duelli, D.M. *et al* (2005) *J. Cell Biol.*, **171**, 493-503

密度勾配遠心 アプリケーション

― 哺乳類細胞と馴化培地からのエクソソームとマイクロベシクルの精製 ―

OptiPrep™ Application Sheet S63 より

1. 培地の調製

使用する培地へのエクソソームのコンタミネーションを最小限にするため、培養前に培地を約 100,000 *g* で 1 ～ 16 時間遠心分離したり、ろ過 (通常は 0.2 ～ 0.22 μm フィルター) して粒子状物質を除去する場合がありますが、必須ではありません。しかし、培地へのサプリメントとして使用されるウシ胎児血清は、超遠心分離やろ過でエクソソームが除去され効果がある場合があります。培地中のエクソソームの影響を避けるために、無血清培地を用いる場合もあります。単層細胞を培養した後に、馴化培地を回収してから密度勾配遠心を行います。

2. イオジキサノール密度勾配遠心のための前処理

2a）遠心分離による分画（低速および高速）

細胞やアポトーシス小体などの大きな粒子を除去するために、低速遠心分離を行う場合があります（例 : 1,000 ～ 2,000 *g*、10 分間）[1]。また超遠心分離によるエクソソームの最終回収の前に、様々な遠心分離スキームが追加されることが多いです。例にあるような最初の低速遠心分離は外したくなるかもしれませんが、このステップを含めないと、高い重力で急速に沈降する大きな粒子の凝集体に小さな小胞が捕捉され、失われる可能性があります。 いくつかの例を表 1 に示します。

表 1

遠心分離の条件	参考文献	遠心分離の条件	参考文献
① 480 *g*/5 min; ② 1,900 *g*/10 min	2	① 500 *g*/15 min; ② 10,000 *g*/30 min	7
① 300 *g*/10 min; ② 5,000 *g*/10 min	3	① 300 *g*/10 min; ② 2,000 *g*/20 min; ③ 20,000 *g*/70 min	8 ※
① 500 *g*/10 min; ② 800 *g*/15 min (2x)	4	① 300 *g*/10 min; ② 1,000 *g*/10 min; ③ 20,000 *g*/25 min	9 ※
① 300 *g*/10 min; ② 2,000 *g*/10 min; ③ 10,000 *g*/20 min	5	① 800 *g*/10 min/10,000 *g*/10 min	10
① 480 *g*/5 min; ② 2,000 *g*/10 min	6	① 500 *g*/10 min/10,000 *g*/30 min	11

※参考文献8と9について：筋肉細胞培養物を含む馴化培地を 20,000 *g* での遠心分離し、マイクロベシクルをペレット化した。エクソソームはこれとは異なり、よりゆっくりと沈降する [8]。この 20,000 *g* で得たペレットにはマイクロベシクルが含まれていることが確認され、その後 vexosome という、rAAV カプシドを含む膜結合粒子のイオジキサノール勾配精製に使用された。rAAV カプシドを含む膜結合粒子は、細胞形質導入におけるベクターの効率的な送達媒体である [9]。

参考情報

◆ マイクロベシクルはヒト血漿からも単離されており [12]、細胞間の miRNA の輸送における因子として同定されている。 血漿を、300 *g*、1,200 *g*、および 10,000 *g* の同様の一連の遠心分離ステップで処理されている。

2b）ろ過

大きな汚染物質の除去は、一般に 0.20 または 0.22 μm シリンジフィルターを使用しますが、場合によっては 0.1 μm [2,6] または 0.45 μm [13] のフィルターを使用することもあります。ろ過は最初の低速遠心分離の前に実行することも [3]、より頻繁に後に実行することもできます [1,2,11,14]。 または、場合によっては 2 回目の高速遠心分離の後に行うこともあります [6]。ろ過を唯一の前処理とする場合もあります [13,15,16,17]。

機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソーム マーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッド バイオプシー
cf-DNA/ cf-RNA 精製
その他
受託サービス

2c）ペレット化によるエクソソームおよびその他の小胞の濃縮

事実上、公開されているすべての方法において、密度勾配遠心分離用の緩衝媒体に再懸濁する前に、エクソソームおよびマイクロベシクルをペレット化する必要があります（100 ～ 150,000 *g* で 1 ～ 2 時間）。例外は、20,000 *g* で筋細胞微粒子 [8] およびベキソソーム（vexosome）[9] を遠心分離する場合です（表 1）。

一部のプロトコール、特に馴化培地の体積が大きい場合に適用されるプロトコールには、100 ～ 150,000 *g* で行う最終的なペレット化の前に体積を減らすため、遠心限外ろ過を使用した予備濃縮が含まれます。この作業の追加により、大容量の超遠心分離機ローターの必要性が回避されます。限外フィルターのカットオフは 5 kDa [2,6] から 100 kDa [4,17] です。

2d）ショ糖密度勾配

イオジキサノール密度勾配遠心の前処理および濃縮手順の一部に、不連続ショ糖密度勾配の処理が含まれる場合があります。複数の 2 層ショ糖密度勾配とイオジキサノール勾配分離を組み合わせることは、Choi らの結腸がん細胞由来のエクソソームに関する研究で研究されました [18]。100,000 *g* で 4 時間遠心分離した後、エクソソームは 0.8 M と 2.7 M のスクロース層の界面に濃縮されると報告されています。また、間葉系幹細胞由来のマイクロベシクルは、同じ 2 層グラジエントで 100,000 *g* で 2 時間遠心分離すると、2 層の界面に濃縮されます [4]。

3. イオジキサノール勾配の実施方法（例）

3a）グラジエント溶液の調製

まずは下記の試薬を用意します。

A.：OptiPrep™
B.：0.85% (w/v) NaCl, **60 mM** HEPES (or Tricine)-NaOH, pH7.4
C.：0.85% (w/v) NaCl, **10 mM** HEPES (or Tricine)-NaOH, pH7.4

溶液 B と C の調製方法 1

ストック溶液：HEPES (free acid) または Tricine を 100 mM（4℃保存）
- HEPES（2.38 g）または Tricine（1.79 g）/100 mL 水。

溶液 B: 0.85 g の NaCl を 30 mL の水に溶解し、HEPES または Tricine ストック溶液 60 mL を追加し、1 M NaOH を加えて pH7.4 に調整する。100 mL にメスアップする。

溶液 C: 0.85 g の NaCl を 30 mL の水に溶解し、HEPES または Tricine ストック溶液 10 mL を追加し、1 M NaOH を加えて pH7.4 に調整する。100 mL にメスアップする。

0.25 M スクロース、1 mM EDTA、20 mM HEPES-NaOH、pH 7.4 など、上記と浸透圧が等しい溶液もご使用いただけます。溶液 B および C は「溶液 B と C の調製方法２」と同様に調製され、NaCl ベースの媒体について説明したのと同じ方法で処理されます。EDTA と緩衝液の濃度はすべての溶液で一定になります。

溶液 B と C の調製方法２

ストック溶液：
- 500 mM HEPES (free acid)、11.9 g/100 mL 水（4℃保存）
- 100 mM EDTA (Na_2・$2H_2O$)、3.72 g/100 mL 水（4℃保存）

溶液 B: スクロース 17 g/100 mL 水に EDTA と HEPES のストック溶液をそれぞれ 2.0 mL と 8.0 mL 追加し、1 M NaOH で pH 7.4 に調整し、200 mL にメスアックする。

溶液 C: スクロース 8.5 g を 50 mL の水に溶解し、6 mL の EDTA ストック液と 24 mL の HEPES ストック液を追加する。
1M NaOH で pH 7.4 に調整し、100 mL にメスアップする。

更に洗練させた方法として、[参考文献 13] に紹介された方法があります。 6% (w/v) イオジキサノール溶液は 215 mM スクロースで、65.4 % (w/v) イオジキサノール溶液は 5 mM スクロースで作られ、どちらの溶液も 2 mM の EDTA、10 mM の Tris-HCl (pH 8.0) が含まれています。

小胞の粗画分と OptiPrep™ の希釈剤は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）などの細胞緩衝液が良く使われます [例 : 参考文献 1、3、11、14 および 15]。場合により、2 mM $MgCl_2$ を追加します [9]。また、生理食塩水にはリン酸緩衝液ではなく、20 mM HEPES-NaOH、pH 7.2 などの有機緩衝液を含ませる場合があります [4、5、18]。0.25 M スクロース、10 mM Tris-HCl pH 7.5 による希釈も一般的です [2、6、8]。また、エクソソームは 20 mM HEPES-NaOH、pH 7.4 などの単純な緩衝液に懸濁され、勾配溶液が調製されることもあります [10,17]。また、100 mM KCl および 2 mM $MgCl_2$ の 20 mM HEPES 緩衝溶液が使用されることもあり ［12]、自己密度勾配形成方法（遠心分離中に勾配が形成される方法）として、OptiPrep™ で粗エクソソーム懸濁液の密度を調整して層を単純に生成することもあります ［16]。

表 2

	エクソソームを精製する馴化培地	Gradient (% w/v) iodixanol ※1	遠心分離の条件	参考文献
1	Breast adenocarcinoma cells (MCF-7)	6 - 40 % cont **60 %**	140,000 *g*/16 h	7
2	Colon carcinoma cells (human)	**0**, 5, 10, 20, 40 % disc	100,000 *g*/16 h	2
3	Colon carcinoma cells (human)	5, 20, **30 %** disc	200,000 *g*/3 h	18
4	Colon carcinoma cells (human)	**0**, 5, 10, 20, 40 % disc	100,000 *g*/18 h	6
5	HEK cells (Epstein-Barr virus proteins)	5 - 30 % cont. **35 %**	Not given	3
6	HEK cells (AAV producer cells) – vexosomes (large-scale)	**0**, 6 - 18 % disc	124,000 *g*/2 h	9
7	HEK cells (HIV-infected)	**0**, 6 - 18 % disc	200,000 *g*/1.5 h	11
8	Human plasma	**0**, 5, 10, 20, 40 % disc	200,000 *g*/21 h	12
9	Lung fibroblasts (human embryo) MRC5	**0**, 6 - 56.4 % cont	110,000 *g*/15 h	13
10	Lymphocytes (T cells), dendritic cells and macrophages): HIV-1 infected cells, resolution of HIV and exosomes in gradient	**0**, 6 - 18 % disc/near-vertical rortor	200,000 *g*/1.25 h	15
11	Lymphocytes (T cells) HIV Nef secretion in exosomes	**0**, 6 - 18 % cont	250,000 *g*/1.5 h	1
12	Lymphocytes (T cells CD^+) HIV resolution from exosomes	**0**, 6 - 18 % disc/near-vertical rotor	200,000 *g*/1.25 h	21
13	Mason-Pfizer monkey virus, induced cell fusion (human lung embryonic cells, human skin fibroblasts, COS-1 and CMMT cells)	**0**, 0.6 - 30 % cont	Not given	14
14	MDCK cells (on permeable tissue culture inserts) – filtrates from apical and basolateral compartments	**10, 20, 30 %** self-generated/vertical rotor	350,000 *g*/3 h	16
15	Medulloblastoma cells (D283MED)	**0**, 6, 12, 18, 24, 30, 36 % disc	100,000 *g*/18 h	17
16	Melanoma cells (B16BL6)	5, 20, **30 %** disc	200,000 *g*/2 h	5
17	Mesenchymal stem cells (human)	5, 20, **30 %** disc	200,000 *g*/3 h	4
18	Mouse brain tumour cell lines	**0**, 6, 12, 18, 24, 30, 36 % disc	100,000 *g*/18 h	10
19	Mouse tumour tissue-derived nanovesicles ※2	5, 20, **30 %** disc	200,000 *g*/2 h	5
20	Muscle cells (differentiated human neonatal myoblasts)	**0**, 5, 10, 20, 40 % disc	100,000 *g*/16 h	8

※ 1　Disc = discontinuous, cont = continuous. サンプルをロードする位置は**赤字**で示す。
※ 2　これらのナノベシクルは、厳密にはエクソソームではないが、エクソソームといくつかの特性を共有している。

3b）密度バリア（Density barrier）

追加で他の膜結合粒子の分離が必要となるような高度な勾配を使用せずに、単純な密度バリアを使用しエクソソームを濃縮するだけで十分な場合もあります。Hasegawa [22] らは、2 % および 50 % (w/v) イオジキサノールの層の上に上皮細胞株からの馴化培地を重ね、100,000 *g* で 1 時間遠心分離しました。 結果として可溶性タンパク質はサンプル層に残り、エクソソームは 2 % ～ 50 % のイオジキサノール界面にバンド化されたと報告されています。

4. 密度勾配遠心でできるエクソソームのバンド密度（banding density）

イオジキサノール勾配で観察されるエクソソームのバンド密度は、多くの操作要因に影響されます。長時間の遠心 (15 ～ 21 時間) では、エクソソームは浮力密度に依存し、これはサンプルを最初に上部に置いたものか、下部に置いたものかには依存しません (表 2 を参照)。異なる細胞および組織からエクソソームを精製すると、観察されるバンド密度に違いが出ている可能性があります。遠心分離時間が短い場合 (1.25 ～ 3 時間)、エクソソームは真のバンド密度に達していない可能性があります。これは、主に沈降速度に基づいてエクソソームが他の粒子から分離される、6 ～ 18 % (w/v) イオジキサノールのトップローディンググラジエントに特に当てはまります。他の勾配システムはこれら 2 つの手法の間に位置し、エクソソームが浮力密度に達したかどうかを判断するのは困難です。

参考情報

◆ 大きな小胞は、小さな小胞よりも速い沈降（または浮遊）速度を示す可能性があるが、小さな小胞の方が浮力密度が高い可能性がある。報告されているエクソソームのバンド密度の一部を表 3 に示す。

技術情報
機能解析
タンパク質 / RNA/DNA 抽出
遺伝子操作
観察
基礎（調製・検出）
EVs・EVs 産生
EVs 精製
エクソソーム マーカー抗体
ELISA
FC/FCCS
リキッドバイオプシー
cf-DNA/ cf-RNA 精製
その他
受託サービス

表 3　報告されている密度勾配遠心時のエクソソームのバンド位置

	細胞の種類※1	グラジエント※2	密度 (g/mL)		細胞の種類※1	グラジエント※2	密度 (g/mL)
1	Carcinoma (breast)	①	1.094 - 1.143	10	Lymphocytes (T cells)	②	1.05 - 1.069
2	Carcinoma (colon)	①	1.10 - 1.12	11	Lymphocytes (T cells)	②	1.04 - 1.055
3	Carcinoma (colon)	③	1.093	14	MDCK cells	④	1.15
4	Carcinoma (colon)	①	1.11	15	Medulloblastoma cells	①	1.11 - 1.15
5	HEK cells	③	1.03 - 1.08	16	Melanoma cells	③	1.087
6	HEK cells – vexosomes	②	1.10	18	Mouse brain tumour cells	①	1.13 - 1.15
8	Plasma	①	1.00 - 1.19	19	Mouse tumour tissue	③	1.087
9	Lung fibroblasts	①	1.09 - 1.11	20	Muscle cells (myoblasts)	①	1.11 - 1.14

※1　**この列の番号は、表 2 の行番号をご参照ください。**
※2　①：密度勾配を作ってからサンプルをトップまたはボトムロードする
②：トップロードでグラジエント作成
③：ボトムロードでグラジエント作成
④：自己密度勾配形成（Self-generated gradients）で作成

参考文献

1. Lenassi, M., Cagney, G., Liao, M., Vaupotĭc, T., Bartholomeeusen, K., Cheng, Y., Krogan, N.J., Plemenită, A. and Peterlin, B.M. (2010) HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander $CD4^+$ T cells *Traffic,* **11**, 110–122

2. Mathivanan, S., Lim, J.W.E., Tauro, B.J., Ji, H., Moritz, R.L. and Simpson, R.J. (2010) Proteomics analysis of A33 immunoaffinity purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature *Mol. Cell. Proteomics,* **9**, 197–208

3. Ruiss, R., Jochum, S., Mocikat, R., Hammerschmidt, W. and Zeidler, R. (2011) EBV-gp350 confers B-cell tropism to tailored exosomes and is a neo-antigen in normal and malignant B cells - new option for the treatment of B-CLL *PLoS One,* **6**: e25294

4. Kim, H-S., Choi, D-Y., Yun, S.J., Choi, S-M., Kang, J.W., Jung, J.W., Hwang, D., Kim, K.P. and Kim, DW. (2012) Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells *J. Proteome Res.,* **11**, 839-849

5. Lee, E-Y., Park, K-S., Yoon, Y.J., Lee, J., Moon, H-G., Jang, S.C., Choi, K-H., Kim, Y-K. and Gho, Y.S. (2012) Therapeutic effects of autologous tumor-derived nanovesicles on melanoma growth and metastasis *PLoS One* **7**: e33330

6. Tauro, B.J., Greening, D.W., Mathias, R.A., Ji, H., Mathivanan, S., Scott, A.M. and Simpson, R.J. (2012) Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes *Methods,* **56**, 293–304

7. Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P. and David, G. (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes *Nat. Cell Biol.,* **14**, 677-685

8. Le Bihan, M-C., Bigot, A., Jensen, S.S., Dennis, J.L., Rogowska-Wrzesinska, A., Lainé, J., Gache, V., Furling, D., Jensen, O.N., Voita, T., Mouly, V., Coulton, G.R. and Butler-Browne, G. (2012) In-depth analysis of the secretome identifies three major independent secretory pathways in differentiating human myoblasts *J. Proteom.,* **77**, 344-356

9. Maguire, C.A., Balaj, L., Sivaraman, S., Crommentuijn, M.H.W., Ericsson, M., Mincheva-Nilsson, L., Baranov, V., Gianni, D., Tannous, B.A., Sena-Esteves, M., Breakefield, X.O. and Skog, J. (2012) Microvesicle-associated AAV vector as a novel gene delivery system *Mol. Ther.,* **20**, 960–971

10. Graner, M.W., Alzate, O., Dechkovskaia, A.M., Keene, J.D., Sampson, J.H., Mitchell, D.A. and Bigner, D.D. (2009) Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes *FASEB J.,* **23**, 1541–1557

11. Columba Cabezas, S. and Federico, M. (2013) Sequences within RNA coding for HIV-1 Gag p17 are efficiently targeted to exosomes *Cell. Microbiol.,* **15**, 412–429

12. Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., Sun, Q., Wang, K., Ba, Y., Wang, Q., Wang, D., Yang, J., Liu, P., Xu, T., Yan, Q., Zhang, J., Zen, K. and Zhang, C-Y. (2010) Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration *Mol. Cell*, **39**, 133–144

13. Mangeot, P-E., Dollet, S., Girard, M., Ciancia, C., Joly, S., Peschanski, M. and Lotteau, V. (2011) Protein transfer into human cells by VSV-G-induced nanovesicles *Mol. Ther.,* **19**, 1656–1666

14. Duelli, D.M., Hearn, S., Myers, M.P. and Lazebnik, Y. (2005) A primate virus generates transformed human cells by fusion *J. Cell Biol.,* **171**, 493-503

15. Cantin, R., Diou, J., Belanger, D., Tremblay, A.M. and Gilbert, C. (2008) Discrimination between exosomes and HIV-1: Purification of both vesicles from cell-free supernatants *J. Immunol. Methods,* **338**, 21-30

16. Casas, E., Barron, C., Francis, S.A., McCormack, J.M., McCarthy, K.M., Schneeberger, E.E. and Lynch, R.D. (2010) Cholesterol efflux stimulates metalloproteinase-mediated cleavage of occludin and release of extracellular membrane particles containing its C-terminal fragments *Exp. Cell Res.,* **316**, 353-365

17. Epple, L.M., Griffiths, S.G., Dechkovskaia, A.M., Dusto, N.L., White, J., Ouellette, R.J., Anchordoquy, T.J., Bemis, L.T. and Graner, M.W. (2012) Medulloblastoma exosome proteomics yield functional roles for extracellular vesicles *PLoS One,* **7**: e42064

18. Choi, D-S., Park, J.O., Jang, C.S., Yoon, Y.J., Jung, J.W., Choi, D-Y., Kim, J-W., Kang, J.S., Park, J., Hwang, D., Lee, K-H., Park, S-H., Kim, Y-K., Desiderio, D.M., Kim, K.P. and Gho, Y.S. (2011) Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer ascites *Proteomics,* **11**, 2745–2751

19. Dettenhoffer, M. and Yu, X-F. (1999) Highly purified human immunodeficiency virus type 1 reveals a virtual absence of Vif virions *J. Virol.,* **73**, 1460-1467 20.

20. Palker, T.J. (1990) Mapping of epitopes on human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein *In: Human Retrovirology: HTLV (ed. Blattner, W.A.) Raven Press,* NY, pp 435-445

21. Park, I-W. and He, J.J. (2010) HIV-1 is budded from $CD4^+$ T lymphocytes independently of exosomes *Virol. J.,* **7**: 234

22. Hasegawa, H., Thomas, H.J., Schooley, K. and Born, T.L. (2011) Native IL-32 is released from intestinal epithelial cells via a non-classical secretory pathway as a membrane-associated protein *Cytokine*, **53**, 74–83

OptiPrep™ Application Sheet S63; 5th edition, January 2020 をもとに訳しました。

Web 検索案内

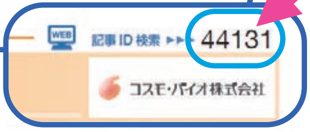
コスモ・バイオのホームページでご検索いただけます。
https://www.cosmobio.co.jp/

検索場所

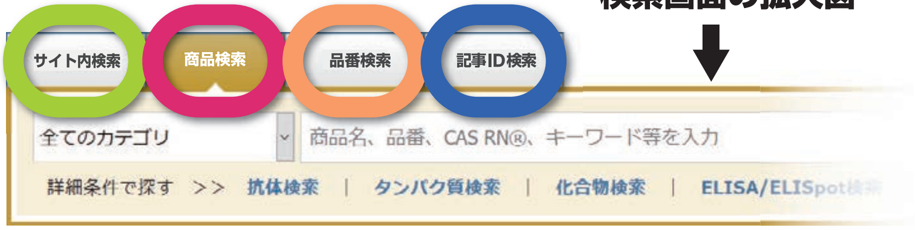
記事 ID 検索

直接 WEB サイト内の記事へ。
カタログでは紹介しきれない情報も手に入ります。

これが記事 ID



検索画面の拡大図



品番検索

品番のみでシンプルに検索

・最大で 10 品番を同時検索
・メーカー指定もできます。

サイト内検索

WEB サイト内 にお探しの情報があるかをキーワードで検索。
商品検索とは異なります。

商品検索

商品名、品番、CAS RN®、キーワード等を入力して検索。

より条件を絞っての検索には、「抗体」、「タンパク質」、「化合物」、「ELISA / ELISpot」、「一般検索」 の**カテゴリ特化検索**をご活用ください。

ご注文に際してのお願い

メーカー略号	メーカー名
ADC	Advanced Cell Diagnostics, a brand of Bio-Techne Corporation
BTI	Biotium, Inc.
CAC	コスモ・バイオ株式会社
CSR	コスモ・バイオ株式会社
HAK	株式会社ハカレル
HNB	HansaBioMed OU
IBA	IBA GmbH
ISP	IMMUNOSTEP, S.L.
LEX	Lexogen GmbH
NOG	Norgen Biotek Corp.
OBL	101 Bio, LLC
PEJ	株式会社レビティジャパン
PGI	Proteintech Group, Inc.
PMC	コスモ・バイオ株式会社 札幌事業部
RBT	RayBiotech, Inc.
SCB	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
SEW	Serumwerk Bernburg AG
TRB	テラベース株式会社
ZEN	Zen-Bio, Inc.

コスモ・バイオでは、取扱メーカーをすべてメーカー略号を用いて注文しやすくしています。同様の品番を複数メーカーで用いている場合がございますので、ご注文時には品番だけでなく品名や包装サイズ、メーカー略号もしくはメーカー名のご確認をお願いいたします。弊社取り扱い代理店経由でご注文ください。

室	室温保存
冷	4℃保存
凍	–20℃保存
凍	–70℃保存

営業部お問い合わせ先

TEL : 03-5632-9610
FAX : 03-5632-9619
E-mail：mail@cosmobio.co.jp

弊社の Web 経由でもお問い合わせいただけます。
Web：https://www.cosmobio.co.jp/ask/contact.asp