

EVSecond L70 プロトコル
(Extracellular Vesicle Isolation by Size Exclusion Chromatography on Drip Column)

【血清前処理】

- ① 血清・血漿を $12,000 \times g$, 4°C , 15 min 遠心分離します。
- ② 底部の沈殿物および上層の脂質を吸わないよう、中層から 50~1,500 μL を採取して試料とします。
(電子顕微鏡撮影、タンパク質、miRNA 解析などには血清・血漿 100~200 μL が標準的です)

【カラム準備】

全ての操作は室温で行ってください。

- ① カラムを転倒混和し、内部の充填剤が**完全に**均一になったことを確認して、スタンド等に設置します。

重要： 充填剤が保存液と十分に混和された状態にならないと後工程の分画が乱れる場合があるため、カラム内に充填剤の塊がない状態で使用してください。

【EVSecond L70 精製】

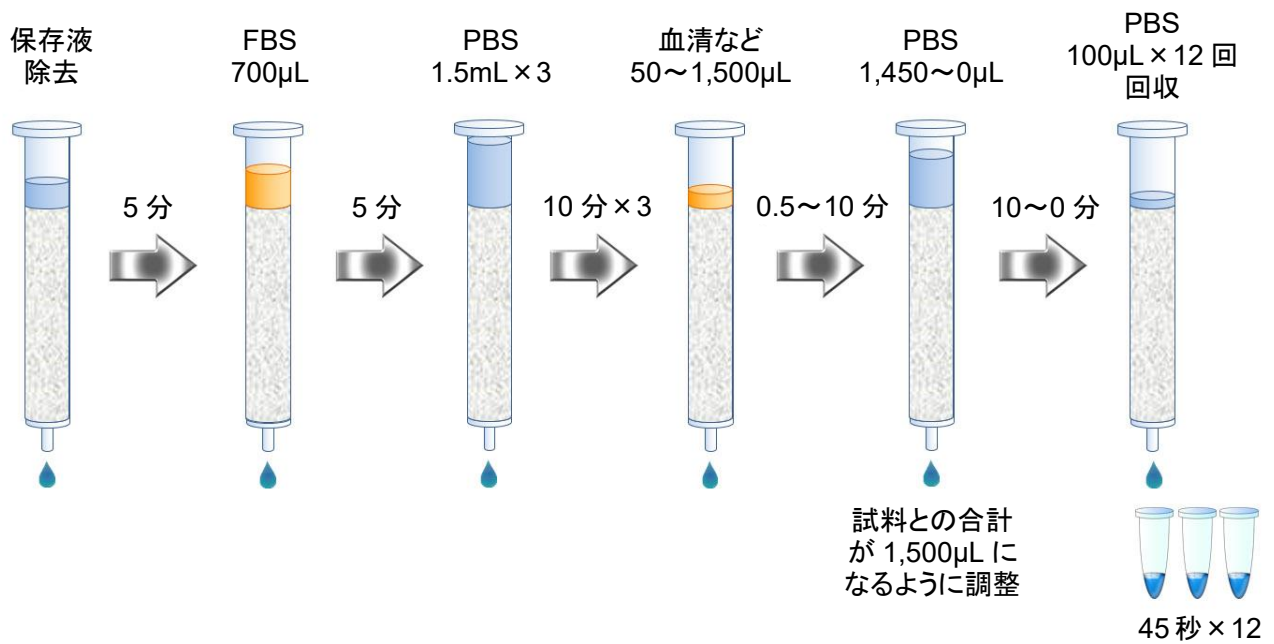
全ての操作を室温、自然落下で行い、各工程では液滴が落ちなくなってから次工程に進めてください。

- ① カラムの上下キャップを外して保存液を排出します(加圧や振動は与えないでください)。
- ② 不要な吸着を抑えるためのブロッキング処理として 0.22 μm シリンジフィルターなどでろ過した FBS(または任意の血清)700 μL をカラムに添加します。
- ③ PBS 1.5 mL を添加してカラムを平衡化します。
- ④ ③を更に 2 回繰り返します。
- ⑤ 前処理済みの血清 50~1,500 μL を静かにカラムに添加し、液滴が落ちなくなるまで流出させます。
※ 添加する血清量を変えても、エクソソームの溶出位置は変化しません。
- ⑥ ⑤で加えた血清試料との合計が 1,500 μL になるように 0~1,450 μL の PBS を静かに添加します。
※ ここまでの流出液は全て廃棄します。
- ⑦ 回収チューブを設置して PBS 100 $\mu\text{L} \times 12$ 回のフラクションを回収します。
※ エクソソーム溶出位置が分かっている場合は、画分をまとめて回収しても構いません。

【溶出位置の確認】

- ① Bradford 法で血清タンパク質の溶出位置を確認します。
- ② Western blotting、ELISA 法などでエクソソームの溶出位置を確認します。
※ 次頁の実施例を参考にしてください。

【フローチャート】（下記の時間は目安です）



【実施例】

赤： CD9-CD9 sandwich ELISA による Exosome 溶出位置の確認。

青： Bradford 法による血清タンパク質画分溶出位置の確認。

血清 200 μL から Exosome を分画精製

