

エクソソーム回収キット

CATAROSEV®

[Code No. CTS-001, CTS-001T, CTS-011]

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

TOYOBO

— 目 次 —

[1] はじめに	1
[2] 製品内容	2
[3] 製品のほかに用意するもの	2
[4] 使用方法	4
[5] 使用上又は取扱い上の注意	7
[6] トラブルシューティング	9

ご注意

- ・本キットは研究用試薬です。食品、化粧品として決して使用しないでください。
- ・本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守するとともに SDS を参照し、安全に留意してください。
- ・サンプルの状態(例: 培地成分や培養条件等)によっては、回収に適さない場合があります。貴重なサンプルをご使用する場合は、同じ細胞や性状の試料を試した後にご利用ください。関係する実験において、人体に有害な試薬を扱う場合も予想されます。各試薬に添付されている注意書き、機器・器具に添付されている取扱説明書の指示を順守し、必要に応じて適切な保護具をご使用になりますようお願いいたします。

注: 本資料に掲載している会社名および商品名・ロゴマークなどは、各社の商号、商標または登録商標です。

[1] はじめに

本キットはエクソソームのサイズと電荷を利用して、試料からエクソソームを回収します。

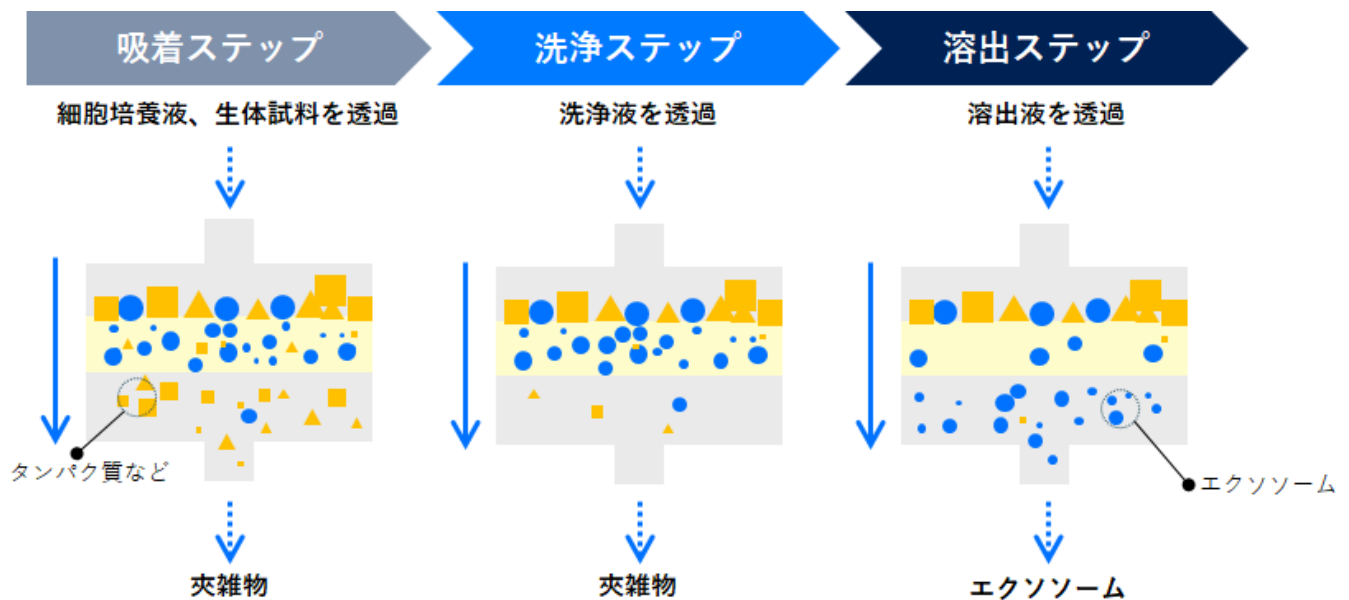
[特長]

- ・煩雑な前処理(試料濃縮等)や高額な装置は不要です。
- ・吸着・洗浄・溶出の3ステップにより、短時間でエクソソームの回収が可能です。
- ・操作が簡便で、高い粒子回収率が達成可能です。

【吸着ステップ】エクソソーム表面の電荷を利用してエクソソームを膜内に吸着させます。

【洗浄ステップ】電荷を持たない夾雑物を除去します。

【溶出ステップ】高塩濃度のバッファーにて膜内に吸着したエクソソームを回収します。



[2] 製品内容

本製品は、以下の構成品からなるキットです。

エクソソーム回収キット CATAROSEV®

	CTS-001	CTS-001T
1. シリンジフィルター(イオン交換膜)	5 セット	1 セット
2. 三方活栓	5 セット	1 セット

保存方法: 冷蔵保存(3ヶ月以内であれば室温保存可能)

[3] 製品のほかに用意するもの

本製品の他に、以下の試薬・機器類をご用意ください。以下は試験1回分です。

- 細胞外小胞を含む試料
 - ・細胞培養上清: 推奨量: 約 10~15mL
 - ・血漿、血清: 推奨量: 約 100~200μL試料によって適切な試験量は異なりますので、必要に応じて試験量を変えてテストしてください。
- シリンジ 20mL × 4本
(推奨: テルモシリンジ™ SS-20LZ/テルモ株式会社製)
- 回収容器 5mL × 1本
(推奨: Protein LoBind® Tubes, 5.0mL 品番0030108302/エッペンドルフ株式会社製)
タンパク質低吸着容器の使用を推奨します。
- 保護具(保護メガネ、保護手袋 等)
- 卓上遠心機、遠心チューブ
- バッファー
 - ・塩濃度調整バッファー × 20mL
 - ・平衡化・洗浄バッファー × 20mL
 - ・溶出バッファー × 20mL

バッファー処方は下記の通りです。

	5mol/L-NaCl	1mol/L トリス-塩酸 緩衝液(pH 7.6) *	精製水
塩濃度調整バッファー (塩濃度 0M)	0 vol%	1 vol%	99 vol%
平衡化・洗浄バッファー (塩濃度 0.1M)	2 vol%	1 vol%	97 vol%
溶出バッファー (塩濃度 0.3M)	6 vol%	1 vol%	93 vol%

* 緩衝液はトリス以外に HEPES を使用しても問題ありません。また pH は 7.6 以外に 7.5 を使用しても問題ありません。

弊社よりバッファー(5 回分)を別販売しています。必要に応じてご購入ください。

品名	Code No.	内容
Buffer Set for CATAROSEV®	CTS-011	・Salt concentration adjustment buffer 100mL (塩濃度調整バッファー) ・Equilibration/washing buffer 100mL (平衡化・洗浄バッファー) ・Elution buffer 100mL (溶出バッファー)

[4] 使用方法

1. 試料の調製

(1) 細胞外小胞を含む試料を準備します。

A. 培養上清の場合

粗大粒子が存在する可能性がある場合は粗濾過を行う(推奨 0.45 μ m フィルターでの粗濾過)。

試料(10~15mL)を、塩濃度調整バッファーを用いて、塩濃度が 0.1M(0.6wt%)程度となるように希釈します※1※2。

※1 塩濃度が高いとエクソソーム回収率が低下する恐れがあります。

※2 塩濃度が低いと抽出液にエクソソーム以外の不純物が混入する恐れがあります。

B. 血漿、血清の場合

室温で、10,000 × g で 5 分間、遠心処理を行い、上清を回収する。

回収した上清(100~200 μ L)を平衡化・洗浄バッファーを用いて、50 倍以上に希釈します※3。

※3 希釈倍率が低いと、均一に透過できず粒子回収率が低下する恐れがあります。

2. 膜の平衡化

(1) シリンジフィルター、三方活栓を開封します。

(2) シリンジに平衡化・洗浄バッファーを 5mL 採取し、シリンジをシリンジフィルターに接合します。



(3) シリンジフィルターの排出口を下にした状態で、シリンジをゆっくりと押し込み、平衡化・洗浄バッファーを注入し、排出口から排出します。押し込み時に空気がシリンジフィルターに入らないように注意します※1。

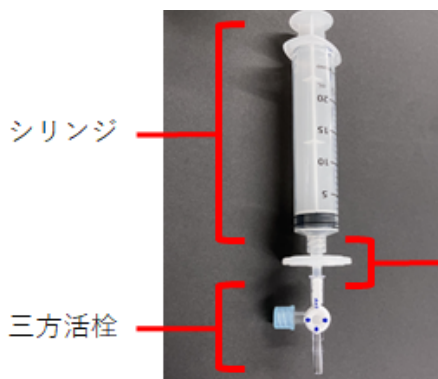
(4) 三方活栓が閉であることを確認し※2、三方活栓を接合します。



×開の状態
コックを捻り右図の状態にする



○閉の状態



三方活栓との取り付け部

シリンジフィルター

(5) シリンジをシリンジフィルターから取り外します。

3. 吸着ステップ

- (1) 「1. 試料の調製」にて用意した試料全量をシリンジで採取し、シリンジをシリンジフィルターに接合します。なお試料がシリンジの容量を超える場合は、3.吸着ステップを繰り返してください。
- (2) 三方活栓を取り外します。
- (3) シリンジフィルターの排出口を下にした状態で、シリンジをゆっくりと押し込み、試料を注入し、排出口から排出します。押し込み時に空気がシリンジフィルターに入らないように注意します※¹。
- (4) 三方活栓を接合します。この際に三方活栓が閉であることを確認します※²。
- (5) シリンジをシリンジフィルターから取り外します。

4. 洗浄ステップ

- (1) シリンジに平衡化・洗浄バッファを 10mL 採取し、シリンジをシリンジフィルターに接合します。
- (2) 三方活栓を取り外します。
- (3) シリンジフィルターの排出口を下にした状態で、シリンジをゆっくりと押し込み、平衡化・洗浄バッファを注入し、排出口から排出します。押し込み時に空気がシリンジフィルターに入らないように注意します※¹。

- (4) 三方活栓を接合します。この際に三方活栓が閉であることを確認します※²。
- (5) シリンジをシリンジフィルターから取り外します。

5. 溶出ステップ

- (1) 回収容器を準備します。
- (2) シリンジに溶出バッファーを2mL採取し、シリンジをシリンジフィルターに接合します。
- (3) 三方活栓を取り外します。
- (4) シリンジフィルターの排出口を下にした状態で、シリンジをゆっくりと押し込み、溶出バッファーを注入し、抽出液を回収します※³。
- (5) 抽出液の垂れに気をつけて、本キットを廃棄します※⁴。

※1 空気がシリンジフィルターに入ると、エア噛みが生じ、適切な回収量が得られない恐れがあります。

※2 三方活栓の流路を開の状態ではシリンジを交換すると、エア噛みが生じ、適切な回収量が得られない恐れがあります。

※3 回収した試料の塩濃度は約 0.25M になります。必要に応じて、塩濃度調整バッファーを用いて、塩濃度を調整してください。

※4 本キットは単回使用となります。複数回使用、洗浄しての再使用は控えていただきますようお願いいたします。

[5] 使用上又は取扱い上の注意

1. 取扱い上の注意

- (1) 細胞外小胞を含む試料を取扱う時は感染性のレベルに合わせて安全キャビネット内で操作を行い、保護メガネ、マスク、使い捨て手袋、実験着などの適切な保護具を着用して、吸い込んだり体に付着したりすることがないようにご注意ください。
- (2) 感染性を有する試料を扱う際は、各施設の安全管理規程に従って十分注意して取扱ってください。
- (3) バッファー、細胞外小胞を含む試料が誤って目や口に入った場合は、直ちに水で十分洗い流すなどの応急処置を行い、医師の診察・治療などを受けてください。
- (4) バッファー、細胞外小胞を含む試料が誤って皮膚に付着した場合は、直ちに多量の水で洗い流してください。
- (5) バッファー、細胞外小胞を含む試料を含む溶液が飛散した場合は手袋とマスク着用の上、エタノールなどの消毒液を使用してしっかりと拭き取ってください。

2. 使用上の注意

- (1) シリンジフィルター、三方活栓は専用のもを使用し、それらは他の目的に転用しないでください。
- (2) シリンジフィルター、三方活栓は必ず貯蔵方法に従って保存してください。開封後はお早めに使用してください。
- (3) シリンジはロックタイプをご使用ください。スリップタイプを使用した場合は外れて、液が飛散する恐れがあります。
- (4) 異なるロットのバッファーを継ぎ足して使用しないでください。
- (5) バッファーの使用後はボトルの蓋を必ずきっちりと閉め、乾燥しないようにしてください。
- (6) シリンジフィルター、三方活栓ならびにバッファーは不純物などの混入により変質する恐れがありますので、汚染させないよう十分ご注意ください。
- (7) シリンジフィルター、三方活栓を落としたり、ぶつけたりしないでください。強いショックを与えると壊れることがあります。
- (8) シリンジフィルター、三方活栓、シリンジの組立、取り外し、操作時は、過度の力を加えないようにしてください。
- (9) シリンジフィルター、三方活栓、シリンジに傷・ひび割れ等が見られる場合は、直ちに新しいものと交換してください。シリンジフィルター、三方活栓、シリンジが破損した際は、指を怪我する恐れがありますので、破損部に触れないように注意し、直ちに廃棄してください。

3. 廃棄上の注意

- (1) 使用済みのキット及びバッファーなどを廃棄する場合には、使用する試料の種類に従って、都道府県知事の許可を受けた専門の廃棄物処理業者と契約し、廃棄物処理法及び関連法規を遵守し、適正に処理してください。

- (2) 感染性の試料を取り扱った際、本キットならびに洗浄、回収された試料は感染性廃棄物に関する規定に従って廃棄してください。

[6] トラブルシューティング

現象	原因	対策
エクソソーム回収量が少ない	回収対象の試料中のエクソソーム含有量が少ない	試料中の推奨粒子個数は 150×10^8 個以上となります。試料中の粒子個数が極端に少なくないか確認してください。
	回収対象の試料中に大きな粒子が多数存在する	試料中に大きな粒子が多数存在すると、フィルター表面に堆積し、詰りが発生する可能性があります。試料を $0.45 \mu\text{m}$ フィルター濾過処理もしくは遠心処理 ($10,000 \times g$ で 5 分間) を行い、粗大粒子を除去した後、回収を実施してください。
	回収対象の試料の塩濃度が高い	試料の塩濃度が高いと、エクソソームが膜に吸着せず、洗浄ステップで損失する可能性があります。試料の電気伝導度の推奨は $8 \sim 11 \text{mS/cm}$ となります。電気伝導度が極端に高い場合は塩濃度の調整を検討してください。
	回収対象の試料中の気泡が多い	気泡を大量に含む試料を用いるとエア噛みが生じ、回収量が低下する可能性があります。攪拌等により気泡が発生しやすい試料を使用する場合は、静置等の処理を行い、試料の気泡を取り除いた後、回収を実施してください。
	操作中にエア噛みが発生している	三方活栓の流路を開の状態、もしくは三方活栓を接合しない状態で、シリンジを交換すると、エア噛みが生じ、回収量が低下する可能性があります。操作方法に問題が無いか確認してください。
	バッファの塩濃度が異なる	平衡化・洗浄バッファの塩濃度が高い、溶出バッファの塩濃度が低いと、回収量が低下する可能性があります。適切な塩濃度バッファを使用しているか確認してください。
	溶出バッファの注入量が少ない	溶出バッファの注入量が少ないと、十分に回収できない可能性があります。適切な量の溶出バッファを注入してください。
	液温が高い	液温が高いと回収率が悪化する可能性があります。室温 (25°C) 以下で、操作を行ってください。
	回収品の保管中にロスが発生している	回収後、長期保管が必要な場合は、冷蔵での保管をお願いします。
	回収容器に吸着しロスが発生している	タンパク質低吸着容器を使用してください。
回収した試料中に夾雑たんぱく質が多い	洗浄が不足している	洗浄バッファの使用量が間違っていないか確認の上、適切な量の洗浄バッファで洗浄してください。
	コンタミの発生	試料に使用したシリンジを再利用するとシリンジに付着した夾雑たんぱく質が混入する恐れがあります。洗浄ステップ、抽出ステップで使用するシリンジは新しい物を使用してください。

	試料の塩濃度が低い	試料の塩濃度が低いと、抽出液にエクソソーム以外の不純物が混入する恐れがあります。試料の電気伝導度の推奨は 8～11mS/cm となります。電気伝導度が極端に低い場合は塩濃度の調整を検討してください。
バッファの通液が困難である	試料中に大きな粒子が多数存在する	試料中に大きな粒子が多数存在すると、フィルター表面に堆積し、詰りが発生する可能性があります。試料を 0.45μm フィルター濾過処理もしくは遠心処理(10,000 × g で 5 分間)を行い、粗大粒子を除去した後、回収を実施してください。
	試料中の気泡が多い	気泡を大量に含む試料を用いるとエア噛みが生じ、通液が困難になる可能性があります。攪拌等により気泡が発生しやすい試料を使用する場合は、静置等の処理を行い、試料の気泡を取り除いた後、回収を実施してください。
	操作中にエア噛みが発生している	三方活栓のコックを開の状態、もしくは三方活栓を接合しない状態で、シリンジを交換すると、エア噛みが生じ、通液が困難になる可能性があります。操作方法に問題が無いか確認してください。



【製造・販売元】

－価格・在庫に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部（大阪）
〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田一丁目 13 番 1 号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部（東京）
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号
京橋 One Terrace
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00（土日祝日、休日を除く）
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <https://lifescience.toyobo.co.jp/>