

## 血漿(plasma)サンプルからのエクソソーム回収: Total Exosome Isolation (from plasma)(Cat#4484450) を用いた濃縮・回収

### (サンプルの前処理)

推奨するスタート量は  
0.1~1mL

1. 血漿サンプルを処理まで氷中に置く  
凍結血漿を使用の場合は、25~37°Cのwater bath中で完全に融解させ、氷中に置く
2. 遠心(2000xg、20min、室温)で細胞や細胞デブリスをペレット化し、新しいチューブに上清を移す(ペレットが混入しないように注意)
3. 遠心(10,000xg、20min、室温)でさらに細胞や細胞デブリスをペレット化し、新しいチューブに上清を移す(ペレットが混入しないように注意)  
次の操作に進むまで氷中に置く

### (エクソソームの濃縮・回収(1): Proteinase処理あり)

きょう雑物として共沈殿するタンパク成分を除去できるため、Proteinase処理を行うことを推奨するが、この処理によってエクソソーム表面タンパク質が分解されてしまう。エクソソームマーカーなどの表面タンパク質の検出等を行う場合は、“**Proteinase処理なし**”のプロトコールで回収を行う事。

1. 前処理した血漿サンプルの0.5倍量(1/2量)の1 x PBSを添加し、均一になるまでよくミックスする
2. サンプルの0.05倍量(1/20量)のProteinase Kを添加し、均一になるまでよくミックスする  
例: 100 $\mu$ Lのスタートの血漿サンプルに対して、5 $\mu$ LのProteinase Kを添加
3. 37°Cで10分間インキュベートする
4. Proteinase処理したmixture(血漿 + PBS)に対して、0.2倍量(1/5量)のTotal Exosome Isolation (from plasma) reagent.を添加し、全体が均一になるまでよくミックスする

血漿 + PBS	Reagent
100 $\mu$ L + 50 $\mu$ L	30 $\mu$ L
1mL + 0.5mL	300 $\mu$ L

注意: ミックス後、白濁する可能性があるがそのまま次のステップへ進むこと

5. 4のmixtureを2~8°Cで30分間 インキュベートする
6. 遠心処理(10,000xg、5分間、室温)  
注意: マウス血漿を使用された場合は4°Cで30分間遠心する



次ページのステップ7へ進む

7. 上清をきれいに排除する。エクソソームはペレット化されて回収される
8. (オプション) 上清が残ってしまった場合は、再度遠心処理(10,000xg、30秒間)し、さらに残った上清をきれいに除去する
9. ペレットを1 x PBSまたは以後のアプリケーションに使用するbufferで懸濁する  
参考: 懸濁するbufferの液量:  
スタート量が 100 $\mu$ Lの場合、 25~50 $\mu$ L  
スタート量が 1mLの場合、 100~500 $\mu$ L
10. エクソソームの保存  
2~8 $^{\circ}$ Cで最大1週間保存可能  
長期保存の場合は、-20 $^{\circ}$ C以下で保存

### (エクソソームの濃縮・回収(2): Proteinase処理なし)

1. 前処理した血漿サンプルの0.5倍量(1/2量)の1 x PBSを添加し、均一になるまでよくミックスする
2. Proteinase処理したmixture(血漿 + PBS)に対して、0.2倍量(1/5量)のTotal Exosome Isolation (from plasma) reagent.を添加し、全体が均一になるまでよくミックスする

血漿 + PBS	Reagent
100 $\mu$ L + 50 $\mu$ L	30 $\mu$ L
1mL + 0.5mL	300 $\mu$ L

注意: ミックス後、白濁する可能性があるがそのまま次のステップへ進むこと

3. 2のmixtureを室温で10分間 インキュベートする
4. 遠心処理(10,000xg、5分間、室温)  
注意: マウス血漿を使用された場合は4 $^{\circ}$ Cで30分間遠心する
5. 上清をきれいに排除する。エクソソームはペレット化されて回収される
6. (オプション) 上清が残ってしまった場合は、再度遠心処理(10,000xg、30秒間)し、さらに残った上清をきれいに除去する
7. ペレットを1 x PBSまたは以後のアプリケーションに使用するbufferで懸濁する  
参考: 懸濁するbufferの液量:  
スタート量が 100 $\mu$ Lの場合、 25~50 $\mu$ L  
スタート量が 1mLの場合、 100~500 $\mu$ L
8. エクソソームの保存  
2~8 $^{\circ}$ Cで最大1週間保存可能  
長期保存の場合は、-20 $^{\circ}$ C以下で保存

