

ExoTrap™ Exosome Isolation Spin Column Kit for protein research

Cat. No. CSR-SHI-EXO-K010

Updated on Aug 8th, 2016

www.cosmobio.com

【1】 Background

Exosomes are 40 –100 nm membrane vesicles. They are found in many biological fluids including blood, urine, saliva, amniotic fluid, cell culture supernatants, and malignant ascites fluids. CD9 is a well known surface marker for exosomes. ExoTrap Spin Columns utilize immobilized CD9 antibody to capture exosomes from biological fluids in as little as 30 minutes. The contents of the captured exosomes are then readily processed for downstream analysis by western blotting, mass spectrometry, PCR, or sequencing, etc.

【2】 Component

Component	Quantity	Storage
ExoTrap™ Spin Column	10	4°C

Required but not provided:

- 1.7 mL tube
- PBS
- Elution Buffer

[3] Protocol for samples with low protein concentration like culture supernatant, urine, cerebrospinal fluid etc...

Note: Sample should be prepared at the discretion of the user. The following recommendations are only guidelines and may be altered to optimize or complement **the user's experimental design.**

Prepare Sample

1. Transfer 10 mL of culture supernatant to 15 mL tube.
2. Centrifuge the tube at 3,000 rpm for 15 minutes at 4°C .
3. Filter the supernatant by syringe and 0.22 µm disc filter and transfer to new tube.

Prepare Column

4. Open the top and bottom caps of ExoTrap™, set the column to 1.7 mL tube and centrifuge at 5,000 rpm for 1 minute at 20°C . Remove the medium.

Load Column with Sample

5. Apply 600 µL of sample to the column and centrifuge at 5,000 rpm for 1 minute at 20°C . Remove the flow through.
6. Repeat procedure 5 for 10 times. (6 mL of supernatant was used in total.)

Wash Sample-Loaded Column

7. Apply 600 µL PBS to the column and centrifuge at 5,000 rpm for 1 minute at 20°C and remove the flow through.
8. Repeat procedure 7 once again and wash the column.

Elute Exosomes

9. Transfer the column to new 1.7 mL tube.
10. Apply 50 µL of the desired elution buffer to the column filter (top of column).

For Western Blotting Analysis: use SDS sample buffer

For Mass spectroscopic Analysis: use a solution of 8M Urea, 50 mM ammonium bicarbonate

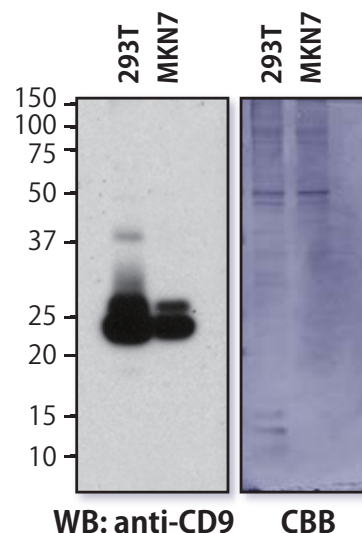
For RNA recover and miRNA Analysis: use a denaturing solution

11. Incubate at 37°C for 30 minutes.
12. Centrifuge at 7,500 rpm for 1 minute at 20°C and collect sample.

Isolation of exosomes from cell culture supernatant

Using ExoTrap™, exosome-derived protein was isolated by 50 µL SDS sample buffer and did western blotting analysis.

Sample: 293T cell culture supernatant, MKN7 cell culture supernatant
Primary Antibody: Anti CD9 (#CSR-SHI-EXO-M01)
(20 µL / lane was applied.)



【4】 Protocol for blood serum or blood plasma

Note: Sample should be prepared at the discretion of the user. The following recommendations are only guidelines and may be altered to optimize or complement the user's experimental design.

Prepare Sample

1. Dilute blood serum or blood plasma 6 times with PBS.
2. Centrifuge at 12,000 rpm for 15 minutes at 4°C .
3. Filter the supernatant by syringe and 0.22 μm disc filter or 0.22 μm spin filter tube and transfer to new tube.

Prepare Column

4. Open the top and bottom caps of ExoTrap™, set the column to 1.7 mL tube and centrifuge at 5,000 rpm for 1 minute at 20°C . Remove the medium.

Load Column with Sample

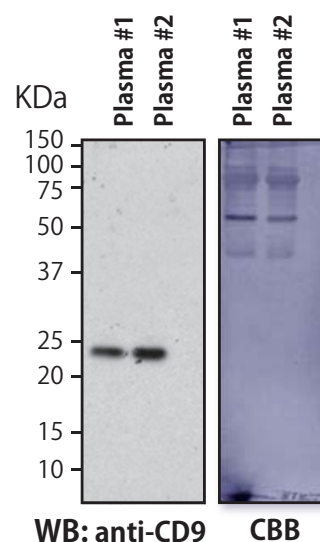
5. Apply 600 μL of sample to the column and centrifuge at 5,000 rpm for 1 minute at 20°C . Remove the flow through.
6. Repeat procedure 5 as needed. (In the example below, 200 μL versenized Human plasma was diluted 6 times and centrifuged twice.)

Wash Sample-Loaded Column

7. Apply 600 μL PBS to the column and centrifuge at 5,000 rpm for 1 minute at 20°C and remove the flow through.
8. Repeat procedure 7 once again and wash the column.

Elute Exosomes

9. Transfer the column to new 1.7 mL tube.
10. Apply 50 μL of the desired elution buffer to the column filter (top of column).
 - For Western Blotting Analysis: use SDS sample buffer
 - For Mass spectroscopic Analysis: use a solution of 8M Urea, 50 mM ammonium bicarbonate
 - For RNA recover and miRNA Analysis: use a denaturing solution
11. Incubate at 37°C for 30 minutes.
12. Centrifuge at 7,500 rpm for 1 minute at 20°C and collect sample.



Sample: Versenized Human plasma
primary antibody: Anti CD9 (#CSR-SHI-EXO-M01)
(20 μL / lane was applied.)

Isolation of exosomes from human plasma

Using ExoTrap™, exosome-derived protein was isolated by 50 μL SDS sample buffer and did western blotting analysis.



COSMO BIO Co., LTD.

TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,
KOTO-KU. TOKYO 135-0016, JAPAN
TEL : (81)3-5632-9617
FAX : (81)3-5632-9618
e-mail : export@cosmobio.co.jp
URL : www.cosmobio.com





一般研究用キット

ExoTrap™ Exosome Isolation Spin Column Kit for protein research

エクソソーム単離キット

Cat. No. SHI-EXO-K010

International Application No.: PCT/JP2012/083612

2015年3月4日作成

www.cosmobio.co.jp

【I】背景と測定原理

エクソソームは細胞から分泌された脂質二重膜で形成される直径40nm～100nm程度の小胞です。生体では唾液、血液、尿、羊水、悪性腹水等の体液中で観察され、培養細胞からも分泌されます。近年、エクソソームには様々なタンパク質やRNAが含まれている事が報告され、細胞間の情報を伝達する役割を担っている可能性が指摘されています。

本製品は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、ヒトの血清、血漿、唾液、尿、培養上清から30分でウエスタンブロット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出来ます。

【II】キット構成

保存温度：4℃

内容	数量	危険表記および取扱上の注意
ExoTrap™ Spin Column	10	成分は労働安全衛生法に非該当ですが、取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。

ご準備いただくもの（その他必要なもの）

- 1.7mL チューブ（BM 機器 #BM4017）
- PBS
- 溶出バッファー

本品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。
本マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。



【Ⅲ】 プロトコール

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

- ① 10 cm dish 1 枚分の細胞培養上清を 15 mL チューブに回収する。※（約 10 mL）
※尿、脳脊髄液などは②から始める。
- ② 3,000 rpm, 4°C 15 min 遠心する。
- ③ シリンジと 0.22 μm ディスクフィルタを用いて上清を濾過し、新しいチューブに回収する。
- ④ ExoTrap™ の上下キャップを開封し、1.7mL チューブ（BM 機器 #BM4017）にカラムをセットし、5000 rpm, 20°C, 1 min 遠心して保存液を捨てる。
- ⑤ サンプル 600 μL をカラムにアプライする。
- ⑥ 5,000 rpm, 20°C, 1 min 遠心し、フロースルー（FT）を除去する。
- ⑦ ⑤～⑥を必要回数繰り返す。（実施例では 10 回サンプルを遠心し、計 6 mL の上清を使用した）
- ⑧ PBS 600 μL をカラムにアプライする。
- ⑨ 5000 rpm, 20°C, 1 min 遠心し、FT を除去する。
- ⑩ ⑧～⑨をもう一度繰り返してカラムを洗浄する。
- ⑪ カラムを新しい 1.7mL チューブに寄せ換える。
- ⑫ 各種アプリケーションに適した溶出バッファ※ 50 μL をカラムのフィルタ部分にアプライする。
※ウエスタンブロッティング：SDS sample buffer
質量分析：8M Urea, 50 mM ammonium bicarbonate
miRNA 分析：任意の RNA 回収用変性溶媒
- ⑬ 37°C, 30 min インキュベートする。
- ⑭ 7500 rpm, 20°C, 1 min 遠心してサンプルを回収する。

血清、血漿サンプル

- ① 血清、血漿を PBS で 6 倍希釈する。
- ② 12,000 rpm, 4°C , 15 min 遠心する。
- ③ シリンジと 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を用いて上清を濾過し、新しいチューブに回収する。
- ④ ExoTrap™ の上下のキャップを開封し、1.7mL チューブにカラムをセットし、5,000 rpm, 20°C , 1 min 遠心して保存液を捨てる。
- ⑤ サンプル 600 μL をカラムにアプライする。
- ⑥ 5,000 rpm, 20°C , 1 min 遠心し、FT を除去する。
- ⑦ ⑤～⑥を必要回数繰り返す。(実施例では EDTA 血漿 200 μL を 6 倍希釈し、2 回遠心した)
- ⑧ PBS 600 μL をカラムにアプライする。
- ⑨ 5,000 rpm, 20°C , 1 min 遠心し、FT を除去する。
- ⑩ ⑧～⑨をもう一度繰り返してカラムを洗浄する。
- ⑪ カラムを新しい 1.7mL チューブに寄せ換える。
- ⑫ 各種アプリケーションに適した溶出バッファー※ 50 μL をカラムのフィルタ部分にアプライする。
※ウエスタンブロッティング：SDS sample buffer
質量分析：8M Urea, 50 mM ammonium bicarbonate
miRNA 分析：任意の RNA 回収用変性溶媒
- ⑬ 37°C , 30 min インキュベートする。
- ⑭ 7500 rpm, 20°C , 1 min 遠心してサンプルを回収する。



実施例は web で公開中です。

弊社ホームページ (<http://www.cosmobio.co.jp>) 内の検索、または検索サイトより、「ExoTrap」と入力し、検索ください。



本商品をご利用になられた文献、発表データを募っております。

本商品をご利用いただき投稿された論文、学会発表/パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。
ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付方法

郵 送

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
コスモ・バイオ株式会社 開発部 宛

E-mail

cosmobio_BD@cosmobio.co.jp ※ PDF ファイルにてお送りください。

