

Code No. 131-19491 (1mL)

Code No. 137-19493 (5mL)

《For research use only》

## MassivEV™ EV Purification Column PS

### 【Product information】

Code No.	Product name	Package	Storage
131-19491	MassivEV™ EV Purification Column PS	1 mL	2-10℃
137-19493		5 mL	

### 【Overview】

MassivEV™ EV Purification Column PS is used for a purification of extracellular vesicles (EVs) from a cell culture supernatant and provides high-purity EVs easily by PS affinity method. PS affinity enables a mild elution of intact EVs with a chelating agent because PS affinity captures phosphatidylserine (PS) on a membrane surface of the EVs in a calcium ion-dependent manner. The approximate dynamic binding capacity (DBC)\* is as follows;

- 1 mL:  $5 \times 10^{11}$  particles/mL resin
- 5 mL:  $2.5 \times 10^{12}$  particles/5 mL resin

\*The DBC may change depending on the conditions of the sample. The above binding capacity

is the result of evaluation using MSC-derived EVs.

### 【Materials and supplies required】

#### 1. Reagent

- 295-96601 MassivEV™ Purification Buffer Set
- Cell culture medium for cell growth and EV production  
e.g.) 132-19345 MSCulture™ High Growth Basal Medium  
133-19331 MSCulture™ High Growth Supplement  
053-09451 EV-Up™ EV Production Basal Medium for MSC, AF  
298-84001 EV-Up™ MSC EV Production Supplement, AF
- 100% Ethanol
- Ultrapure water

## 2. Instruments

The following instruments may or may not be required depending on the operation.

- Centrifuge
- Cell strainer (e.g. FALCON #352340)
- 5 µm filter (e.g. GVS #1215396)
- 0.8 µm filter (e.g. GVS #1214568).
- 0.22 µm filter (e.g. Corning #431118)
- Incubation or water bath (which can be warmed at 37°C)
- Peristaltic Pump (e.g. KrosFlo Research Jr)
- Collection tube (e.g. Corning #430791)
- Ultrafiltration membrane [100kDa/PES material] (e.g. Zartrius #VS0141)
- Gel-filtration columns (e.g., PD SpinTrap G-25)

### 【Reagent preparation】

The volume of 1CV (column volume) is as follows;

- 1 mL column: 1CV = 1 mL
- 5 mL column: 1CV = 5 mL

#### **1. Washing Buffer (1x)**

Add 4CV of Washing Buffer (10x) to 36CV of ultrapure water.

e.g.) In the case of 40 mL preparation

Add 4 mL of Washing Buffer (10x) to 36 mL of ultrapure water.

#### **2. EV Binding Enhancer/Washing Buffer**

Add 1/100 volume of EV Binding Enhancer (100x) to 20CV of Washing Buffer (1x).

e.g.) In the case of 20 mL preparation

Add 200 µL of EV Binding Enhancer (100x) to 20 mL of Washing Buffer (1x).

#### **3. EV Elution Buffer (1x)**

Add 0.4CV of EV Elution Buffer to 3.6CV of ultrapure water.

e.g.) In the case of 4 mL preparation

Add 400 µL of EV Elution buffer (10x) to 3.6 mL of ultrapure water.

#### **4. Elution/EV-Stabilizer Buffer (1x)**

Add 1/100 volume of EV-Stabilizer A or B to 4CV of EV Elution Buffer (1x) depending on the purpose of buffer exchange after EV elution.

e.g.) In the case of 4 mL preparation

Add 40  $\mu$ L of EV-Stabilizer A or B to 4 mL of Elution Buffer (1x).

Buffer exchange procedure	Effect	EV-Stabilizer	Administration to animal
(A) Gel filtration	Buffer exchange only	A	Possible
(B) Ultrafiltration	Buffer exchange and concentration	B	Not recommend

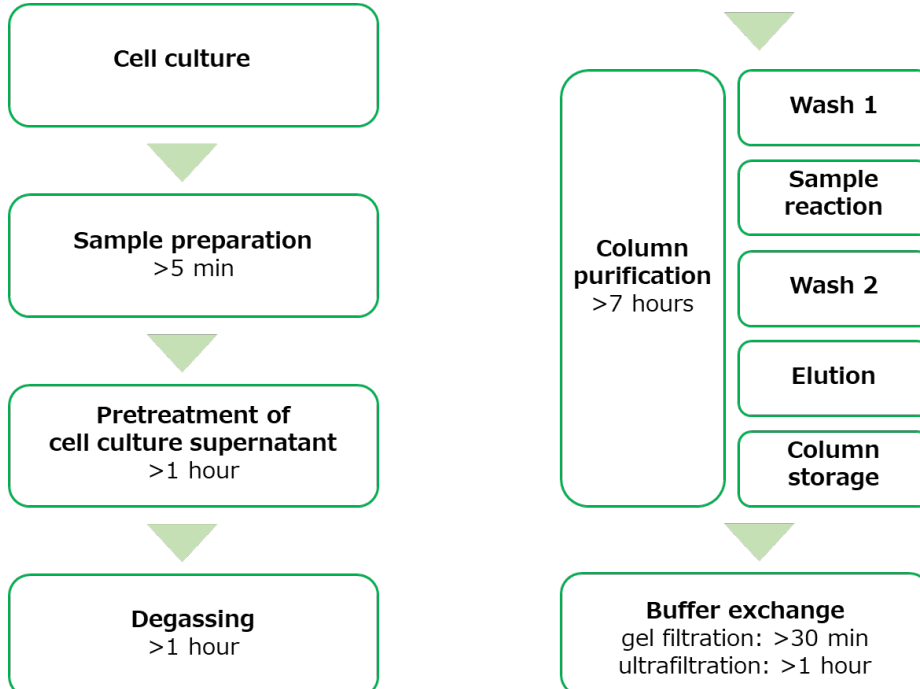
### 5. 20% Ethanol/Storage Buffer (1x)

Add 0.2CV of Storage Buffer (10x) and 0.4CV of 100% Ethanol to 1.4CV ultrapure water.

e.g.) In the case of 2 mL preparation

Add 200  $\mu$ L of Storage Buffer (10x) and 400 $\mu$ L of 100% Ethanol to 1.4 mL ultrapure water.

[Flowchart]



**【Procedure】**

**① Cell culture**

- (1) Perform cell expansion culture and EV production culture.
- (2) Collect the cell culture supernatant.
- (3) Store under refrigeration (2-10°C) or freezing (-20°C or less) as needed.

- Recommend using serum-free medium for EV production. When using a medium supplemented with serum for EV production, impurities may be adsorbed to the resin. It may accelerate the performance deterioration of the resin.

**② Addition of EV Binding Enhancer**

- (1) Add 1/100 volume of EV Binding Enhancer (100x) to cell culture supernatant of ①.

- No need to add calcium if the medium contains 2 mM or more calcium.
- Recommend adding calcium when its concentration in the medium is unknown.
- The excessive addition of calcium may cause precipitation, but the precipitation can be removed by filter treatment in the subsequent process.

**③ Pretreatment of cell culture supernatant**

To remove impurities, select one of the following methods and perform pretreatment.

Option A: centrifugal pretreatment

- (1) Centrifuge cell culture supernatant of ② (5,000 x g, 20 min).

- (2) Collect the supernatant.
- (3) Process (2) with a 0.8 µm filter.
  - Recommend using the PES filter.
  - Centrifugation processing speed is based on the result of our internal study. If 0.22 µm filtering is possible in the next degassing step, other centrifugation speeds (e.g. 10,000 x g for 60 minutes) is acceptable.

Option B: filters pretreatment

- (1) Process the cell culture supernatant from ② with a 40 µm cell strainer.
- (2) Process (1) with a 5 µm filter.
- (3) Process (2) with a 0.8 µm filter.

- Recommend using the PES filter.

#### ④ Degassing the culture supernatant

- (1) Warm the pretreated culture supernatant from procedure ③ in a 37°C incubator or water bath to a temperature above RT (25-28°C).
- (2) Process (1) with a 0.22 µm filter.

- When a refrigerated sample is returned to RT, the air in the vaporized liquid may cause air to enter the column. Therefore, make sure that the sample temperature after heating is higher than RT.
- Recommend using the PES filter.

#### ⑤ Column purification – Wash 1

In order to avoid air contamination into the column, please bring the buffers back to RT in the procedures from ⑤ to ⑨.

- (1) Stand the column for about 10 min to return it to RT after taking it from the refrigerator.
- (2) Flow 10CV of Washing Buffer (1x) using a Peristaltic Pump.

- Recommended flow rate is as follows;  
1 mL column  $\leq 0.85$  mL/min 5 mL column  $\leq 4.25$  mL/min
- To prevent air from entering the column, fill the joint of the column with buffer before connecting it to the Peristaltic pump. Also, bring all buffers back to RT before use.

#### ⑥ Column purification – Sample reaction

- (1) Flow the degassed sample (④) using the Peristaltic Pump at RT and react it with resin.

- Recommended flow rate is as follows;  
1 mL column  $\leq 0.6$  mL/min 5 mL column  $\leq 3$  mL/min
- It is also possible to react at a low temperature (2-10°C). In that case, set the flow rate lower than when performing the reaction at RT and react overnight.

#### ⑦ Column purification – Wash 2

- (1) Wash the resin in the column with 20CV of EV Binding Enhancer/Washing Buffer using the Peristaltic Pump.

- Recommended flow rate is as follows;  
1 mL column  $\leq 0.85$  mL/min 5 mL column  $\leq 4.25$  mL/min

**⑧ Column Purification – Elution**

- (1) To replace 40% of EV Binding Enhancer/Washing Buffer in the column, flow 0.4CV of EV Elution/EV-Stabilizer Buffer (1x).
- (2) Set the collection tube under the column.
- (3) Flow 3.6CV of EV Elution/EV-Stabilizer Buffer (1x) using the Peristaltic Pump and collect the eluate.

- Recommended flow rate is as follows;  
1 mL column  $\leq 0.2$  mL/min 5 mL column  $\leq 1.0$  mL/min
- Set the flow rate of elution slower than that of procedure ⑥.

**⑨ Column purification – Column storage**

- (1) Flow 10CV of Washing Buffer (1x) using a Peristaltic Pump.
- (2) To replace buffer in the column, flow 2CV of 20% Ethanol/Storage Buffer (1x).
- (3) Wrap the parafilm on the top of the column and store it at 2-10°C.

- In the step (1), recommend setting the flow rate slower than that in procedure ⑥ Sample reaction.
- Recommended flow rate is as follows;  
1 mL column)  $\leq 0.6$  mL/min 5 mL column  $\leq 3$  mL/min
- The column can be reused up to five times.
- Wrap the parafilm around the red frame in the figure below.



## ⑩ Buffer exchange

### (A) Buffer exchange by gel filtration

- (1) Add 1/100 volume of EV Stabilizer A to the buffer to be replaced.
- (2) Load the eluate (purified EVs) onto the gel filtration column.
- (3) Perform gel filtration using the buffer prepared in (1).
- (4) Collect the filtrated sample.
- (5) Sterilize the sample with a 0.22 µm filter.

- Refer to the manual for the gel filtration column for a gel filtration method and required amount of buffer.
- Recommended gel filtration columns
  - PD SpinTrap G-25 : Cytiva#28-9180-04
  - PD MidiTrap G-25 : Cytiva#28-9180-08
  - PD Desalting columns : Cytiva#17-0851-01
- The gel filtration is not able to concentrate the eluate.
- When using a large-size gel filtration column, the sample collected in procedure ⑧ may dilute by void volume.
- Depending on the efficiency of gel filtration, it may be necessary to perform gel filtration multiple times to remove EDTA.

### (B) Buffer exchange by ultrafiltration

- (1) Add 1/100 volume of EV-Stabilizer B to the buffer to be replaced (27 times the volume of the eluted sample).
- (2) Add the elute (purified EV) to a 100kDa ultrafiltration membrane.
- (3) Add 9-fold volume of the buffer containing EV-Stabilizer B (prepared in (1)) to (2) and perform ultrafiltration (e.g. 5,000 x g, 10-20 min).
- (4) Repeat (3) two times (total of three ultrafiltration = 1,000 x buffer exchange).
- (5) Collect the sample after ultrafiltration to the new tube.
- (6) Sterile the sample with a 0.22 µm filter.

- Make sure to use the ultrafiltration membrane made of PES.

【Troubleshooting: In the case of air contamination into the column】

Air contamination into the column may be removed by passing 20% or 70% ethanol at the following flow rates. However, please note that the performance of the resin may deteriorate due to air contamination.

Flow rate: 1 mL column 0.85 mL/min 5 mL column 4.25 mL/min

Reference photos; before air contamination→after air contamination→air removal process→after air removal



上述试剂仅供实验研究用,不可用作“医药品”、“食品”、“临床诊断”等。

Listed products are intended for laboratory research use only, and not to be used for drug, food or human use. / Please visit our online catalog to search for other products from FUJIFILM Wako: <https://labchem-wako.fujifilm.com> / This leaflet may contain products that cannot be exported to your country due to regulations. / Bulk quote requests for some products are welcomed. Please contact us.

### 富士胶片和光(广州)贸易有限公司

广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼  
3002-3003室

北京 Tel: 13611333218

上海 Tel: 021 62884751

广州 Tel: 020 87326381

香港 Tel: 852 27999019

询价: [wkgz.info@fujifilm.com](mailto:wkgz.info@fujifilm.com)

官网: [labchem.fujifilm-wako.com.cn](http://labchem.fujifilm-wako.com.cn)

官方微信



目录价查询





コード No. 131-19491

コード No. 137-19493

《研究用試薬》

## MassivEV™ EV Purification Column PS

### 【製品情報】

コード No.	製品名	容量	保存条件
131-19491	MassivEV™ EV Purification Column PS	1 mL	冷蔵
137-19493		5 mL	

### 【概要】

本製品は、細胞外小胞（EV）精製用カラムです。細胞培養上清から高純度な EV を PS アフィニティ一法によって簡便に精製できます。EV の膜表面に存在するホスファチジルセリン（PS）にカルシウム依存的に結合する物質を応用しているため、キレート剤によりインタクトな状態で EV を溶出することができます。本製品の動的結合容量\*の目安は、次のとおりです。

1 mL:  $5 \times 10^{11}$  particles/mL レジン

5 mL:  $2.5 \times 10^{12}$  particles/5 mL レジン

\*当社が MSC 由来 EV を用いて設定した条件で測定した値のため、条件によっては変化する場合があります。

### 【本品以外に準備するもの（□: チェック欄）】

#### 1. 試薬

- 295-96601 MassivEV™ Purification Buffer Set
- 培地（細胞増殖用培地/EV 産生用培地）
  - 例) 132-19345 MSCulture™ High Growth 基礎培地
  - 133-19331 MSCulture™ High Growth サプリメント
  - 053-09451 EV-Up™ MSC EV 産生用基礎培地
  - 298-84001 EV-Up™ MSC EV 産生用サプリメント
- 100%エタノール
- 超純水

2. 器具：手法によって要不要が異なります。操作方法をご確認ください。

- 遠心機
- セルストレーナー（例：FALCON #352340）
- 5  $\mu\text{m}$  フィルター（例：GVS #1215396）
- 0.8  $\mu\text{m}$  フィルター（例：GVS #1214568）
- 0.22  $\mu\text{m}$  フィルター（例：Corning #431118）
- インキュベーターもしくはウォーターバス（37°C加温できるもの）
- ペリスタポンプ（例：KrosFlo Research Jr）
- 回収用チューブ（例：Corning #430791）
- 限外ろ過膜【100kDa/PES 素材】（例：ザルトリウス #VS0141）
- ゲル濾過カラム（例：PD SpinTrap G-25）

#### 【試薬の準備】

1CV(カラムボリウム)は、次のとおりです。

1CV = 1 mL

5CV = 5 mL

#### 1. Washing Buffer (1×) の調製

超純水 36CV に Washing Buffer (10×) を 4CV 添加する。

例) 40 mL 調製の場合

超純水 36 mL に対して 4 mL の Washing Buffer (10×) を添加

#### 2. EV Binding Enhancer/Washing Buffer の調製

Washing Buffer (1×) 20CV に 1/100 量の EV Binding Enhancer (100×) を添加する。

例) 20 mL 調製の場合

20 mL の Washing Buffer (1×) に 200  $\mu\text{L}$  の EV Binding Enhancer (100×) を添加

#### 3. EV Elution Buffer (1×) の調製

超純水 3.6CV に EV Elution Buffer (10×) 0.4CV を添加する。

例) 4 mL 調製の場合

3.6 mL の超純水に 400  $\mu\text{L}$  の EV Elution Buffer (10×) を添加

#### 4. Elution/EV-Stabilizer Buffer (1×) の調製

EV 溶出後のバッファー交換目的に応じて、EV Elution Buffer (1×) 4CV に 1/100 量の EV-Stabilizer

A あるいは B を添加する。

例) 4 mL 調製の場合

4 mL の EV Elution Buffer (1×) に 40 μL の EV-Stabilizer A もしくは B を添加

バッファー交換手法	効果	添加する EV-Stabilizer	動物への投与
(A)ゲル濾過	バッファー交換のみ	A	可
(B)限外ろ過	バッファー交換・濃縮	B	推奨しない

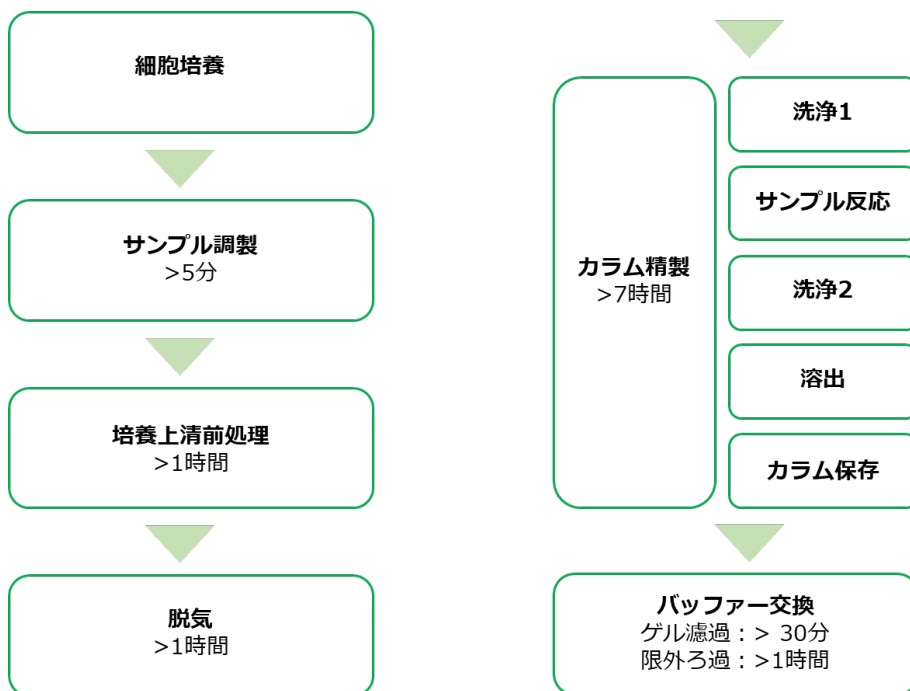
#### 5. 20%エタノール/Storage Buffer (1×) の調製

超純水 1.4CV に Storage Buffer (10×) 0.2CV と 100%エタノール 0.4CV を添加する。

例) 2 mL 調製の場合

1.4 mL の超純水に 200 μL の Storage Buffer (10×) と 400 μL の 100%エタノールを添加

#### 【工程フロー】



## 【操作方法】

### ① 細胞培養

- (1) 任意の細胞の増殖培養と EV 産生培養を行う。
- (2) 任意の細胞の培養上清を回収する。
- (3) 必要に応じて冷蔵 (2-10℃) もしくは冷凍 (-20℃以下) で保存する。

・ EV 産生培地に血清培地を使用した場合、不純物がレジンに吸着し、レジンの性能劣化が早まる可能性があります。そのため、EV 産生用培地は無血清培地の使用を推奨します。

### ② EV Binding Enhancer の添加

- (1) ①の培養上清に EV Binding Enhancer (100×) を 1/100 になるように添加する。

・ 培地にカルシウムが 2mM 以上含まれている場合は添加不要です。  
・ 培地中のカルシウム濃度が不明の場合は添加することを推奨いたします。  
・ 過剰にカルシウムを添加することで結晶が析出することがありますが、後工程のフィルター処理で除去することが可能です。

### ③ 培養上清前処理

夾雑物を除去するために、以下のいずれかの方法で前処理を実施してください。

#### A. 遠心分離による前処理の場合

- (1) ②の培養上清を遠心分離処理 (5,000×g, 20 分間) する。
- (2) 上清を回収する。
- (3) (2)を 0.8 μm フィルター濾過処理する。

・ PES 素材のフィルター使用を推奨いたします。  
・ 遠心処理速度は当社検討の実績です。次の脱気工程で 0.22 μm フィルター濾過処理が実施可能であれば、その他の遠心速度(例：10,000×g 60 分間)でも遠心分離処理が可能です。

#### B. フィルターによる前処理の場合

- (1) ②の培養上清を 40 μm セルストレーナーで濾過処理する。
- (2) (1)の濾液を 5 μm フィルター濾過処理する。
- (3) (2)の濾液を 0.8 μm フィルター濾過処理する。

・ PES 素材フィルターの使用を推奨いたします。

#### ④ 培養上清の脱気

- (1) ③の前処理済み培養上清を室温以上の温度（25-28℃）になるように 37℃のインキュベーターもしくはウォーターバスで加温する。
- (2) 0.22 μm フィルター濾過処理する。

- ・ 冷蔵保存していたサンプルを室温に戻す際に気化した液体中の空気がカラムへのエア混入の原因になることがあります。そのため、必ず加温後のサンプル温度が室温より高くなることを確認してください。
- ・ PES 素材フィルターの使用を推奨します。

#### ⑤ カラム精製 - 洗浄 1

カラムへのエア混入を避けるため、以降のカラム精製工程（⑤~⑨）ではバッファを室温に戻してからご使用下さい。

- (1) カラムを冷蔵庫から取り出して 10 分程度静置し、室温に戻す。
- (2) ベリスタポンプを使用して 10CV の Washing Buffer (1×) を流す。

- ・ 推奨流速は、次のとおりです。  
1 mL カラムの場合：≤0.85 mL/min    5 mL カラムの場合：≤4.25 mL/min
- ・ エアがカラム内に入らないように、あらかじめカラムの接合部分をバッファで満たしてからベリスタポンプと接合させてください。また、バッファ類は全て室温に戻してからご使用下さい。

#### ⑥ カラム精製 - サンプル反応

- (1) ベリスタポンプを用いて④で脱気処理したサンプルを室温で流し、レジンと反応させる。

- ・ 推奨流速は、次のとおりです。  
1 mL カラムの場合：0.6 mL/min    5 mL カラムの場合：3 mL/min
- ・ 低温（2-10℃）で反応させることも可能です。その場合は室温での実施時よりも流速を低く設定し、オーバーナイトで反応させてください。

#### ⑦ カラム精製 - 洗浄 2

- (1) ベリスタポンプを用いて 20CV の EV Binding Enhancer/Washing Buffer でカラム内のレジンを

洗浄する。

- ・ 推奨流速は、次のとおりです。  
1mL カラムの場合： $\leq 0.85\text{mL/min}$  5mL カラムの場合： $\leq 4.25\text{mL/min}$

#### ⑧ カラム精製 - 溶出

- (1) カラム内の EV Binding Enhancer/Washing Buffer を 40%以上置換させるため、ベリスタポンプを用いて 0.4CV の EV Elution/EV-Stabilizer Buffer (1×) を流す。
- (2) 回収用チューブをカラムの下に設置する。
- (3) ベリスタポンプを用いて 3.6CV の EV Elution/EV-Stabilizer Buffer (1×) を流し、溶出液を回収する。

- ・ 推奨流速は、次のとおりです。  
1mL カラムの場合： $\leq 0.2\text{mL/min}$  5mL カラムの場合：1mL/min
- ・ 溶出の流速は、⑥サンプル反応の流速よりも遅く設定する。

#### ⑨ カラム精製 - カラム保存

- (1) ベリスタポンプを用いて 10CV の Washing Buffer (1×) を流す。
- (2) カラム内を置換するため、2CV の 20%エタノール/Storage Buffer(1x) を流す。
- (3) カラム上部にパラフィルムを巻いて冷蔵 (2-10℃) で保存する。

- ・ 工程(1)は、⑥サンプル反応の流速以下に設定することを推奨します。
- ・ 推奨流速は、次のとおりです。  
1 mL カラムの場合： $\leq 0.6\text{ mL/min}$  5 mL カラムの場合： $\leq 3\text{ mL/min}$
- ・ カラムは最大 5 回まで再利用可能です。
- ・ パラフィルムは下図の赤枠部分に巻いてください。



赤枠部分に  
パラフィルムを巻く

## ⑩ 溶出液のバッファー交換

### (A) ゲル濾過によるバッファー交換

- (1) 置換したいバッファーに対し、1/100 量の EV stabilizer A を添加する。
- (2) 溶出液（精製 EV）をゲル濾過カラムに乗せる。
- (3) (1)で調製したバッファーを用いてゲル濾過を実施する。
- (4) ゲル濾過したサンプルを回収する。
- (5) 0.22  $\mu\text{m}$  フィルターにより無菌化処理を行う。

- ・ ゲル濾過の方法やバッファーの必要量は使用するゲル濾過カラムのマニュアルを参照してください。
- ・ 推奨ゲル濾過カラム  
PD SpinTrap G-25 : Cytiva#28-9180-04  
PD MidiTrap G-25 : Cytiva#28-9180-08  
PD Desalting columns : Cytiva#17-0851-01
- ・ ゲル濾過では濃縮はできません。
- ・ サイズが大きいゲル濾過カラムを使用する場合、ボイドボリュームにより⑧で回収したサンプルが希釈される場合があります。
- ・ ゲル濾過の効率によっては、EDTA 除去のため複数回ゲル濾過を実施する必要がある場合がございます。

### (B) 限外濾過によるバッファー交換

- (2) 置換したいバッファー（溶出サンプルの 27 倍量）に対し、1/100 量の EV-Stabilizer B を添加する。
- (3) 溶出液（精製 EV）を 100kDa 限外濾過膜に添加する。
- (4) 9 倍量の EV-Stabilizer B 含有バッファー（(1) で用意したもの）を添加し、限外濾過を実施する(遠心目安：5000g 10-20 分)。
- (5) (3)をさらに 2 回繰り返す（合計 3 回の限外濾過=1,000 倍のバッファー交換）。
- (6) 新しいチューブに限外濾過後のサンプルを回収。
- (7) 0.22 $\mu\text{m}$  フィルターにより無菌化処理を行う。

- ・ 必ず PES 素材の限外濾過膜をご使用ください。

#### 【トラブルシューティング：カラムにエアが混入した場合】

20%エタノールまたは 70%エタノールを下記流速で通液することで、カラムに混入したエアを除去で

きる場合がございます。ただし、エア混入によりレジンの性能が劣化する可能性がありますのでご注意ください。

(流速) 1mL カラムの場合 : 0.85mL/min 5mL カラムの場合 : 4.25mL/min

参考写真 : エア混入前→エア混入後→エア除去工程→エア除去後



上述试剂仅供实验研究用,不可用作“医药品”、“食品”、“临床诊断”等。

Listed products are intended for laboratory research use only, and not to be used for drug, food or human use. / Please visit our online catalog to search for other products from FUJIFILM Wako: <https://labchem-wako.fujifilm.com> / This leaflet may contain products that cannot be exported to your country due to regulations. / Bulk quote requests for some products are welcomed. Please contact us.

#### 富士胶片和光(广州)贸易有限公司

广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼  
3002-3003室

北京 Tel: 13611333218

上海 Tel: 021 62884751

广州 Tel: 020 87326381

香港 Tel: 852 27999019

询价: [wkgz.info@fujifilm.com](mailto:wkgz.info@fujifilm.com)

官网: [labchem.fujifilm-wako.com.cn](http://labchem.fujifilm-wako.com.cn)

官方微信



目录价查询

