

FUJIFILM**Wako**

Code No. 296-83701 (96 reactions)

**CD9-Capture Human Exosome
ELISA Kit (Streptavidin HRP)****[Materials Supplied]**

Components	Amount	State	Preparation before use
(A) Anti-CD9 Antibody-immobilized 96 Well Plate	8 well × 12 strips / 1 plate	Use after washing	Wash 3 times with Washing Buffer (1 ×).
(B) Plate Seal	4 sheets	–	–
(C) Sample Reaction Buffer	50 mL × 1 vial	Ready-to-Use	–
(D) Antibody Reaction Buffer	50 mL × 1 vial	Ready-to-Use	–
(E) Washing Buffer (10 ×)	100 mL × 1 vial	Concentrated. Use after dilution.	Bring it to room temperature before opening and dispense the required volume. Dilute 10 times with purified water (distilled water). [Washing Buffer (1 ×)]
(F) Control Biotinylated Antibody Anti-CD9 (100 ×)	120 μL × 1 tube	Concentrated. Use after dilution.	Dilute 100 times with Antibody Reaction Buffer. [Biotinylated antibody]
(G) HRP-conjugated Streptavidin (100 ×)	240 μL × 1 tube	Concentrated. Use after dilution.	Dilute 100 times with Antibody Reaction Buffer. [HRP-conjugated Streptavidin (1 ×)]
(H) TMB Solution	12 mL × 1 vial	Ready-to-Use	–
(I) Stop Solution	12 mL × 1 vial	Ready-to-Use	–
(J) Instruction Manual	1 copy	–	–

[Storage]

Store at 2-10°C.

[Materials Required, Not Supplied]

Purified water (distilled water)
Biotinylated antibody against any extracellular vesicle surface marker protein (for detection except human CD9) If a biotinylated antibody is unavailable, antibodies can be labeled with biotin using Biotin Labeling Kit-SH (Code No. 348-90941) or Biotin Labeling Kit-NH ₂ (Code No. 347-90891).
Reference Standard (for quantitative analysis) Prepare purified extracellular vesicles from appropriate culture supernatants of cell strain or body fluids using MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (Code No. 293-77601) or PS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit (Code No. 290-80301). Measure protein concentration and particle number. Make sure that the purified extracellular vesicles have any surface marker protein and use it as the reference standard.

— 1/8 —

[Other supplies Required]

Test tubes for dilution of samples and antibodies
Glassware for preparation of Reaction/Washing Buffer (Graduated cylinder)
Micropipettes
Syringe-type repeating dispenser (If available) Such as Eppendorf Multipette or ThermoFisher Finnpiquette
Disposable reservoir (As necessary)
Paper towels to remove the remained solution in the wells after washing steps
Vortex-type mixer
Shaker for microplate (500 rpm) Recommended products : Code No. 623-05671 MS 3 digital, Code No. 627-05691 MS 3 basic
Automatic washer for 96-well plate (If available) Recommended products : Code No. 510-22411 HydroFlex M8Ch2
Microplate reader capable of measuring at 450 nm, with the correction wavelength set at 600-650 nm Recommended products : Code No. 518-84231 InfiniteF50R
Software for data analysis Recommended products : Code No. 290-34631 PLATEmanager V5/I PC SET (for infinite)

[Standard Curve Preparation for Quantitative Measurement]
(for quantitative analysis)

Dilute the reference standard of extracellular vesicles to an appropriate concentration with Sample Reaction Buffer in order to make its absorbance value at 450 nm (absorbance at 620 nm is subtracted) for ELISA measurement to be within the range of 0.1 to 3.0.

[Sample Dilution]

Dilute the sample appropriately with Sample Reaction Buffer using a tube, etc. so that the absorbance at 450 nm (value obtained by subtracting the absorbance at a secondary wavelength of 620 nm) measured by this ELISA is in the range of 0.2 to 2.5^{*1,2}.

※1 Dilute cell culture supernatant, serum, and heparin plasma samples twice or more. It is also recommended to dilute other samples at least 2 times.

※2 Since the appropriate dilution rate of the sample varies greatly depending on the concentration of extracellular vesicles in the sample and the amount of surface protein marker to be detected, it is recommended to serially dilute the sample and preliminarily examine the appropriate dilution rate.

[Assay Procedure]

- 1) Wash each well of Anti-CD9 Antibody-immobilized 96 Well Plate (only strips to use) 3 times with 300 to 350 μL of Washing Buffer (1 ×)^{*3}.
- 2) Add 100 μL of sample dilutions, standard dilutions (when quantitative analysis is performed), and Sample Reaction Buffer as a blank to each well.
- 3) Cover with Plate Seal^{*4}. Incubate for 2 hours at room temperature (20 to 25°C) with shaking at about 500 rpm using a microplate shaker^{*5}.

— 2/8 —

- 4) Discard the solution and wash 3 times with 300 to 350 μL of Washing Buffer (1 \times)^{※3}.
- 5) Add 100 μL of biotinylated antibody to each wells.
- 6) Cover with new Plate Seal^{※4}. Incubate for 1 hour at room temperature (20 to 25°C) with shaking at about 500 rpm using a microplate shaker^{※5}.
- 7) Discard the solution and wash 3 times with 300 to 350 μL of Washing Buffer (1 \times)^{※3}.
- 8) Add 100 μL of HRP-conjugated Streptavidin (1 \times) to each wells.
- 9) Cover with new Plate Seal^{※4}. Incubate for 2 hours at room temperature (20 to 25°C) with shaking at about 500 rpm using a microplate shaker^{※5}.
- 10) Discard the solution and wash 5 times with 300 to 350 μL of Washing Buffer (1 \times)^{※3}.
- 11) Add 100 μL of TMB Solution brought to room temperature to each wells. Shake for about 1 minute using microplate shaker.
- 12) Cover with new Plate Seal^{※4}. Incubate for 30 minutes at room temperature (20 to 25°C).
- 13) Add 100 μL of Stop Solution brought to room temperature to each wells.
- 14) Shake for about 5 seconds by microplate shaker. Measure immediately the absorbance at 450 nm and 620 nm as reference wavelength (600-650 nm)^{※6} using a microplate reader.

※3 After the last wash, turn the plate upside down on a stack of paper towels and tap it lightly to remove the liquid remaining in the wells.

※4 When plate strips are separately used, cut a Plate Seal into a size of the strips for use.

※5 Incubation with shaking at about 500 rpm using a microplate shaker is recommended since standing condition may cause low detection sensitivity and large well to well variation.

※6 Reference wavelength can be used in the range of 600-650 nm.

【Calculation of Results】

In the following calculation, use the calculated value at 450 nm obtained by subtracting the absorbance readings at 620 nm (600-650 nm).

〈Qualitative measurement〉

Calculate the value by subtracting the absorbance readings of blank at 450 nm from the absorbance readings of diluted sample at 450 nm, and compare it between samples.

〈Quantitative measurement〉

- 1) Calculate the value by subtracting the absorbance readings of blank at 450 nm from the absorbance readings of diluted samples at 450 nm^{※7}.
- 2) Calculate the value by subtracting the absorbance readings of blank at 450 nm from the absorbance readings of dilution series of the reference standard at 450 nm.
- 3) Prepare a standard curve by plotting the absorbance readings (Y-axis) against values of standard concentration (X-axis)^{※8}.
- 4) Determine the unknown sample concentration from the Standard Curve^{※9} and multiply the value by the dilution factor.

※7 When the absorbance value of the diluted sample falls outside the absorbance range of standard curve, dilute it again to the appropriate concentration and perform the measurement.

※8 Prepare a new standard curve for each assay performed.

※9 The use of a 3rd order regression curve for log-log plot or 4 or 5 parameters method for log-normal plot in computer calculation is recommended.

【Precaution】

- Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection.
- Avoid contact of skin and mucous membranes with kit reagents or specimens. If any reagents come in contact with eyes, skin, or mucous membranes, wash with copious amounts of water and contact a physician.
- Handle any reagents carefully for preventing any transmissions during laboratory procedures. This kit contains reagents of animal origin.
- Used samples and tips should be rinsed in 1% formalin, 2% glutaraldehyde or more than 0.1% sodium hypochlorite solution for more than 1 hour or be treated by autoclaving before disposal. Dispose of waste in accordance to applicable national, regional or local regulations.
- When allowing the plate to incubate in each step, always affix a plate seal to protect the wells from drying, contamination with foreign matters, uneven temperature, and evaporation of the dispensed reagents.
- ELISA can be easily affected by the laboratory environment. Follow the assay procedure and the temperature in the laboratory should be strictly maintained at 20-25°C. Also, avoid measurement in an environment with wind current (including air conditioner wind) and low humidity.
- Avoid cross contamination of samples or reagents by changing tips between sample, standard and reagent additions.

【Additional Information】

Detailed information about this kit is available on our website. Please review this information of a better understanding of product features, performance, and operation.

Please access from the URL below and search by Product Code.

<https://labchem-wako.fujifilm.com>

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
 Telephone : + 81-6-6203-3741
 Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
 Richmond, VA 23237
 U.S.A.
 Telephone : + 1-804-271-7677
 Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
 D-41468 Neuss
 Germany
 Telephone : + 49-2131-311-0
 Facsimile : + 49-2131-311-100
<http://www.wako-chemicals.de>

Code No. 296-83701 (96 reactions)

CD9-Capture Human Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)

【構成】

構成	容量	状態	使用前の調製
(A) Anti-CD9 Antibody-immobilized 96 Well Plate	8well×12strips/1枚	洗浄後使用	洗浄液(1×)で3回洗浄する。
(B) Plate Seal	4枚	-	-
(C) Sample Reaction Buffer	50mL×1本	そのまま使用	-
(D) Antibody Reaction Buffer	50mL×1本	そのまま使用	-
(E) Washing Buffer (10×)	100mL×1本	調製後使用	室温に戻してから開封し、必要量を分注する。精製水(蒸留水)で10倍希釈する。[洗浄液(1×)]
(F) Control Biotinylated Antibody Anti-CD9 (100×)	120μL×1本	調製後使用	Antibody Reaction Bufferで100倍希釈する。[ビオチン標識抗体反応液]
(G) HRP-conjugated Streptavidin (100×)	240μL×1本	調製後使用	Antibody Reaction Bufferで100倍希釈する。[HRP標識streptavidin反応液(1×)]
(H) TMB Solution	12mL×1本	そのまま使用	-
(I) Stop Solution	12mL×1本	そのまま使用	-
(J) 取扱説明書	1部	-	-

【保存条件】

冷蔵(2~10℃)

【キット以外に必要な試薬】

精製水(蒸留水)

任意の細胞外小胞表面マーカー検出用のビオチン標識抗体(ヒトCD9以外を検出する場合)
ビオチン標識抗体が入手できない場合は、Biotin Labeling Kit-SH(Code No. 348-90941)またはBiotin Labeling Kit-NH₂(Code No. 347-90891)を用いて非標識抗体をビオチン標識することができる。

任意の細胞外小胞表面マーカーを有する精製細胞外小胞(定量解析を行う場合)

適切な細胞株培養上清または体液検体からMagCapture™ Exosome Isolation Kit PS(Code No. 293-77601)またはPS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit(Code No. 290-80301)を用いて細胞外小胞を精製する。タンパク質濃度と粒子数を測定する。精製した細胞外小胞が任意の表面マーカータンパク質を有することを確認し、標準品として使用すること。

【必要な器具】

検体、抗体希釈用チューブ
反応/洗浄液調製用ガラス器具(メスシリンダーなど)
マイクロピペット
連続分注ピペットまたは8連分注ピペット(あれば好ましい)
ディスポーザブルリザーバー(8連分注ピペットを利用する場合)
ペーパータオル等の吸水性のあるもの(洗浄後にプレートに残った液を取り除く)
ボルテックスミキサー
回転式マイクロプレート振とう器(約500rpm) 推奨品: Code No. 623-05671 プレートシェーカー MS 3 digital, Code No. 627-05691 プレートシェーカー MS 3 basic
96 ウエルプレート用洗浄機(あれば好ましい) 推奨品: Code No. 510-22411 HydroFlex M8Ch2
96 ウエルプレートリーダー(450±10nmと600~650nmが測定できる吸光度測定用) 推奨品: Code No. 518-84231 InfiniteF50R
データ計算用ソフトウェア 推奨品: Code No. 290-34631 PLATEmanager V5/I PC SET (for infinite)

【標準曲線作成用の細胞外小胞標準品希釈系列の調製(定量測定を行う場合)】

細胞外小胞標準品をELISA測定(450nmの吸光度値(副波長620nmの吸光度を差し引いた値)が0.1~3.0の範囲に入る希釈系列となるように、キット付属のSample Reaction Bufferを用いて適切な濃度に希釈を行う。

【検体の希釈】

ELISA測定(450nmの吸光度値(副波長620nmの吸光度を差し引いた値)が0.2~2.5の範囲に入るように、チューブなどを用いて検体をキット付属のSample Reaction Bufferで適宜希釈を行う^{*1,2}。

*1 細胞培養上清、血清、ヘパリン血漿サンプルは2倍以上に希釈する。他の検体についても2倍以上に希釈することを推奨する。

*2 検体中の細胞外小胞の濃度や検出対象の表面タンパク質マーカーの量などにより、適切な検体の希釈率は大きく異なるため、検体を段階希釈して適切な希釈率を予備検討することを推奨する。

【操作法】

- 1) Anti-CD9 Antibody-immobilized 96 Well Plate(使用分のストリップ)の各ウェルを、洗浄液(1×)300~350μLで3回洗浄する^{*3}。
- 2) 検体希釈液、標準品希釈液(定量測定の場合)、ブランクとしてSample Reaction Bufferを各ウェルに100μLずつ分注する。
- 3) プレートシールを貼り^{*4}、マイクロプレート振とう器を用いて約500rpmで攪拌しながら室温(20~25℃)で2時間反応させる^{*5}。
- 4) 反応終了後、反応液を捨て、各ウェルを洗浄液(1×)300~350μLで3回洗浄する^{*3}。
- 5) ビオチン標識抗体反応液を各ウェルに100μLずつ分注する。
- 6) プレートシールを貼り^{*4}、マイクロプレート振とう器を用いて約500rpmで攪拌しながら室温(20~25℃)で1時間反

応させる^{※5}。

- 7) 反応終了後、反応液を捨て、各ウエルを洗浄液 (1 ×) 300 ~ 350 μL で3回洗浄する^{※3}。
 - 8) HRP 標識ストレプトアビジン反応液を各ウエルに 100 μL ずつ分注する。
 - 9) プレートシールを貼り^{※4}、マイクロプレート振とう器を用いて約 500rpm で攪拌しながら室温 (20 ~ 25℃) で2時間反応させる^{※5}。
 - 10) 反応終了後、反応液を捨て、各ウエルを洗浄液 (1 ×) 300 ~ 350 μL で5回洗浄する^{※3}。
 - 11) 各ウエルに室温に戻した TMB Solution を 100 μL ずつ分注し、マイクロプレート振とう器を用いて約1分間攪拌する。
 - 12) プレートシールを貼り^{※4}、室温 (20 ~ 25℃) で30分間静置反応させる。
 - 13) 各ウエルに室温に戻した Stop Solution を 100 μL ずつ添加する。
 - 14) マイクロプレート振とう器を用いて約5秒間攪拌後、速やかに96ウエルマイクロプレートリーダーで450nmの吸光度と副波長620nm (600 ~ 650nm)^{※6}の吸光度を測定する。
- ※3 最後の洗浄の後、重ねたペーパータオルなどの上でプレートを逆にし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除く。
- ※4 プレートストリップを分割して使用する場合、プレートシールをストリップのサイズに合わせてカットして使用する。
- ※5 静置条件で反応させると検出感度が低下し、ウエル間誤差も大きくなる傾向があるため、回転式マイクロプレート振とう器を用いて約500rpmで攪拌しながら反応させることを推奨する。
- ※6 副波長は600 ~ 650nmの範囲で使用できる。

【計算】

以下の計算で使用する450nm吸光度値は副波長620nm (600 ~ 650nm) の吸光度値を差し引いた値を使用する。

〈定性測定の場合〉

希釈検体の450nm吸光度値からブランクの450nm吸光度値を差し引いた値を算出し、検体間で比較する。

〈定量測定の場合〉

- 1) 希釈検体の450nm吸光度値からブランクの450nm吸光度値を差し引いた値 (希釈検体吸光度値) を算出する^{※7}。
 - 2) 標準品希釈系列の450nm吸光度値からブランクの450nm吸光度値を差し引いた値 (標準品吸光度値) を算出する。
 - 3) X軸を標準品濃度、Y軸を標準品吸光度値の標準曲線グラフを作成する^{※8}。
 - 4) 標準曲線より、各希釈検体吸光度値に対応する濃度を読み取る^{※9}。読み取った濃度に検体希釈率を乗じ測定値とする。
- ※7 希釈検体の吸光度値が標準曲線吸光度範囲から外れた場合、適当倍率に希釈し直して再度測定を実施する。
- ※8 標準曲線は測定毎に作成する。
- ※9 コンピュータソフトでの演算処理では、3次多項式、4または5パラメーターの使用を推奨する。

【注意事項】

- ・準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につける。
- ・試薬類を皮膚に付けない。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要な場合は医師の手当てを受ける。

- ・感染の危険性がある検体は充分注意して取り扱う。本キットは動物由来の成分を含む。
- ・使用済みの検体、使用した消耗品等は1%ホルマリン、2%グルタルアルデヒドまたは0.1%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に1時間以上浸ける。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄する。使用済みの検体、使用した消耗品や未使用の薬品類は所属施設の規定並びに各地域の法令に従って廃棄すること。
- ・各ステップでの反応時には、ウエルの乾燥、異物の混入、温度の偏り、分注試薬の蒸発を防止する為、必ずプレートシールを貼る。
- ・ELISA法は測定環境により影響を受ける。測定操作、反応場所の室温:20 ~ 25℃ (実験台上またはインキュベータ内温度) を厳守する。また、気流 (エアコン風を含む) や湿度が低い環境での測定は避ける。
- ・ウエル間のクロスコンタミネーションに配慮し測定を実施する。

【その他の情報】

本キットに関する詳細な情報は当社ホームページで案内しています。

製品の特長、性能、操作をより深く理解していただくために、この情報をご確認下さい。

下記URLからアクセスしていただき、製品コードで検索して下さい。

<https://labchem-wako.fujifilm.com>

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪府中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741