

コード No. 294-85701

《研究用試薬》

EV-Perm™ エクソソーム膜透過処理用キット

【製品情報】

コード No.	製品名	容量	保存条件
294-85701	EV-Perm™ エクソソーム膜透過処理用キット	1 キット	冷凍 (-20℃)

【キット内容】

構成成分	容量	保存条件
Reagent A (20×)	500 μL×1 本	冷凍 (-20℃)
Reagent B (10×)	5 mL×1 本	融解前：冷凍 (-20℃) 融解後：冷蔵 (2~10℃)
Reagent C (100×)	500 μL×1 本	融解前：冷凍 (-20℃) 融解後：冷蔵 (2~10℃)

【本製品の保存方法】

各試薬は上記保存条件に従って保存してください。

製品を小分けする場合の各試薬の保存方法

1. Reagent A (20×)

解凍後、軽くタッピングし、すぐに必要量の溶液を分注します。残りの溶液は蓋をしっかりと閉め、すぐに冷凍保存 (-20℃) して下さい。

- ・ 液体の状態で長時間保管すると成分が析出する場合がございます。
- ・ 析出が見られた場合、60℃、30分程度加熱し溶解後に冷凍で保存してください。

2. Reagent B (10×) および Reagent C (100×)

解凍後、軽くタッピングし、すぐに必要量の溶液を分注します。残りの溶液は蓋をしっかりと閉め、冷蔵保存 (2~10℃) して下さい。

【本製品について】

本製品は、細胞外小胞の**内部マーカーの検出**を可能にする試薬です。これまで PS Capture™ エクソソーム ELISA キットシリーズや PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキットでは検出対象が細胞外小胞の表面マーカーの検出に限定されていました。しかし、本品と併用することで細胞外小胞膜表面の透過性を向上させて内部マーカーを検出することができます。

PS Capture™ エクソソーム ELISA キットと併用する場合

【キット以外に準備するもの】

① ELISA キット (□チェック欄) :

下記キットいずれか

コード No.	品名
297-79201	PS Capture™ エクソソーム ELISA キット (抗マウス IgG POD)
298-80601	PS Capture™ エクソソーム ELISA キット (ストレプトアビジン HRP)

② 試薬内訳 (□チェック欄) :

精製水 (蒸留水)

任意の細胞外小胞の内部マーカー検出抗体

PS Capture™ エクソソーム ELISA キット (抗マウス IgG POD)を使用の場合はマウスモノクローナル抗体を、PS Capture™ エクソソーム ELISA キット (ストレプトアビジン HRP)を使用の場合はビオチン標識抗体をそれぞれご用意ください。

③ PS Capture™ エクソソーム ELISA キット付属試薬

Washing Buffer (10×)

Exosome Binding Enhancer (100×)

Reaction Buffer

Exosome Binding Enhancer、Reaction Buffer は PS Capture™ Exosome ELISA Kit に付属のものをご使用下さい。本キットに Buffer を使用しても PS Capture™ Exosome ELISA Kit で使用する Buffer が足りなくなることはありません。

④ 器具内訳 (□チェック欄) :

マイクロウェルプレート (PS Capture™ エクソソーム ELISA キット付属品)

プレートシール (PS Capture™ エクソソーム ELISA キット付属品)

マイクロプレート振とう器

【細胞外小胞サンプルの準備】

PS Capture™ エクソソーム ELISA キット（抗マウス IgG POD）使用の場合

本品を用いて目的のマーカーを検出するためには、使用する細胞外小胞の濃度を最適化する必要があります。細胞外小胞の至適濃度は、PS Capture™ エクソソーム ELISA キット（抗マウス IgG POD）で測定し、得られた吸光度（450 nm から 620 nm を引いたもの）が 0.2~2.5 の範囲に入るように調製します。細胞外小胞の濃度調製はキットに同包されている反応/洗浄液（1×）で希釈してください。

PS Capture™ エクソソーム ELISA キット（ストレプトアビジン HRP）使用の場合

本品を用いて目的のマーカーを検出するためには、使用する細胞外小胞の濃度を最適化する必要があります。細胞外小胞の至適濃度は、PS Capture™ エクソソーム ELISA キット（ストレプトアビジン HRP）で測定し、得られた吸光度（450 nm から 620 nm を引いたもの）が 0.2~2.5 の範囲に入るように調製します。細胞外小胞の濃度調製はキットに同包されている Reaction Buffer で 2 倍以上に希釈してください。

【試薬の準備】

1. 透過処理液の調製

下記の表 1 を参照し、各試薬を希釈する。希釈後、よく混合する。

表 1. 透過処理液に用いる各試薬の希釈倍率と試薬添加量

試薬名	希釈倍率	12 サンプル※ (24 ウェル)	24 サンプル※ (48 ウェル)	48 サンプル※ (96 ウェル)
精製水（蒸留水）	-	2.1 mL	4.2 mL	8.4 mL
Reagent A (20×)	20 倍	125 µL	250 µL	500 µL
Reagent B (10×)	10 倍	250 µL	500 µL	1.0 mL
Reagent C (100×)	100 倍	25 µL	50 µL	100 µL
Total	-	2.5 mL	5.0 mL	10.0 mL

※ n = 2 で ELISA を行うと仮定したときの試薬添加量です。

2. ネガティブコントロール溶液の調製

下記の表 2 を参照し、各試薬を希釈する。希釈後、よく混合する。

(ネガティブコントロール溶液の調製には Reagent A は添加しない)

表 2. ネガティブコントロールに用いる各試薬の希釈倍率と試薬添加量

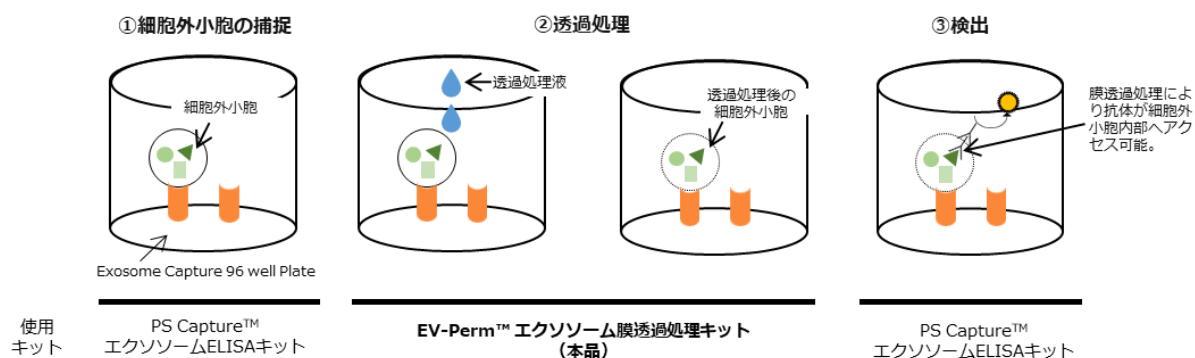
試薬名	希釈倍率	12 サンプル※ (24 ウェル)	24 サンプル※ (48 ウェル)	48 サンプル※ (96 ウェル)
精製水 (蒸留水)	-	2.2 mL	4.5 mL	8.9 mL
Reagent B (10×)	10 倍	250 μL	500 μL	1.0 mL
Reagent C (100×)	100 倍	25 μL	50 μL	100 μL
Total	-	2.5 mL	5.0 mL	10.0 mL

※ n = 2 で ELISA を行うと仮定したときの試薬添加量です。

3. 洗浄液 (1×) の調製

PS Capture™ エクソソーム ELISA キットに付属の Washing Buffer (10×) を精製水で 10 倍希釈した後、希釈液に対して 1/100 量の Exosome Binding Enhancer (100×) を添加し、よく混合してください。

【反応フロー図】



【操作手順】

1. 工程フロー

工程		使用試薬・機器	時間
1.	細胞外小胞の捕捉 (透過処理対象サンプルの準備)	洗浄	洗浄液 (1×)
		細胞外小胞の捕捉	細胞外小胞含有サンプル 反応/洗浄液 (1×) / Reaction Buffer
		洗浄	洗浄液 (1×)
2.	透過処理 (本キットを使用)	透過処理*	① 透過処理液 ② ネガティブコントロール溶液
		洗浄	洗浄液 (1×)

※ 透過処理工程では、各サンプルおよび検出条件ごとに透過処理液およびネガティブコントロール溶液をそれぞれ反応させてください。

以下の工程は、PS Capture™ エクソソーム ELISA キットに従い実施する。

工程		使用試薬・機器	時間
3.	一次抗体反応	一次抗体反応	任意の細胞外小胞マーカー検出用 抗体反応液
		洗浄	洗浄液 (1×)
4.	二次抗体反応/HRP 標識ストレプトアビジン反応	二次抗体反応/HRP 標識ストレプトアビジン反応	二次抗体反応液 もしくは HRP 標識ストレプトアビジン反応液
		洗浄	洗浄液 (1×)
		発色反応	TMB Solution Stop Solution
5.	検出	マイクロプレートリーダー	>30 分間

2. 操作方法 (工程フロー「2. 透過処理」)

- (1) PS Capture™ エクソソーム ELISA キットの取扱説明書に従い、一次抗体反応液添加前の洗浄工程 (【操作法】 4)) まで進める。
- (2) 100 μL の透過処理液または 100 μL のネガティブコントロール溶液を細胞外小胞サンプル (ウェル) に加える。

- (3) プレートシールを貼り、マイクロプレート振とう器を用いて、500 rpm で攪拌しながら室温、1 時間反応させる。
- (4) 反応液をデカンテーション（傾斜法）で捨て、各ウェルを 300~350 μ L の洗浄液（1 \times ）で 3 回洗浄する。
- (5) 工程フロー「3. 一次抗体反応」からは、PS CaptureTM エクソソーム ELISA キット取扱説明書に従い、「【操作法】 5）」の工程に進む。

測定後の計算や解析方法については PS CaptureTM エクソソーム ELISA キット取扱説明書をご確認ください。

PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキットと併用する場合

【キット以外に準備するもの】

① フローサイトメトリーキット（チェック欄）：

使用するキット

コード No.	品名
297-79701	PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット

② 試薬内訳（チェック欄）：

精製水（蒸留水）

任意の細胞外小胞の内部マーカー検出抗体

蛍光標識抗体をご用意ください。

③ PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット付属試薬

Washing Buffer（10×）

Exosome Binding Enhancer（100×）

細胞外小胞結合磁気ビーズ

Exosome Binding Enhancer は PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキットに付属のものをご使用下さい。本キットに Buffer を使用しても PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキットで使用する Buffer が足りなくなることはありません。

④ 器具内訳（チェック欄）：

遠沈管（15 mL）

マイクロチューブ（1.5 mL）

ボルテックスミキサー

卓上遠心機

磁気スタンド

【試薬の準備】

1. 透過処理液の調製

下記の表 1 を参照し、各試薬を希釈する。希釈後、よく混合する。

表 1. 透過処理液に用いる各試薬の希釈倍率と試薬添加量

試薬名	希釈倍率	2 反応分 (添加量 100 μ L) ※	4 反応分 (添加量 167 μ L) ※	8 反応分 (添加量 300 μ L) ※
精製水 (蒸留水)	-	126 μ L	184.8 μ L	294 μ L
Reagent A (20 \times)	20 倍	7.5 μ L	11 μ L	17.5 μ L
Reagent B (10 \times)	10 倍	15 μ L	22 μ L	35 μ L
Reagent C (100 \times)	100 倍	1.5 μ L	2.2 μ L	3.5 μ L
Total	-	150 μL	220 μL	350 μL

※ 添加量は、PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキットの取扱説明書の表 2「サンプル (μ L)」をご参照ください。

2. ネガティブコントロール溶液の調製

下記の表 2 を参照し、各試薬を希釈する。希釈後、よく混合する。

(ネガティブコントロール溶液の調製には Reagent A は添加しない)

表 2. ネガティブコントロールに用いる各試薬の希釈倍率と試薬添加量※

試薬名	希釈倍率	2 反応分 (添加量 100 μ L) ※	4 反応分 (添加量 167 μ L) ※	8 反応分 (添加量 300 μ L) ※
精製水 (蒸留水)	-	133.5 μ L	195.8 μ L	311.5 μ L
Reagent B (10 \times)	10 倍	15 μ L	22 μ L	35 μ L
Reagent C (100 \times)	100 倍	1.5 μ L	2.2 μ L	3.5 μ L
Total	-	150 μL	220 μL	350 μL

※ 添加量は、PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキットの取扱説明書の表 2「サンプル (μ L)」をご参照ください。

3. WB (+Enhancer) の調製

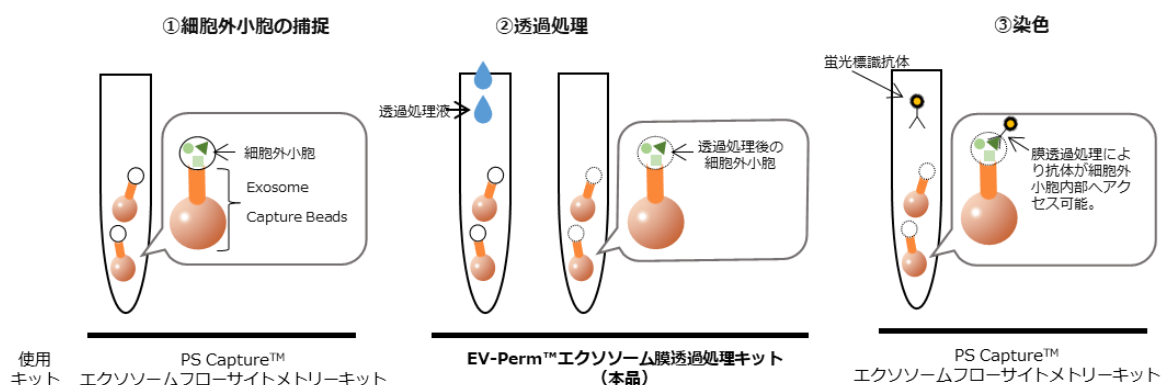
15mL 遠沈管に 0.5 mL の Washing Buffer (10 \times) と 4.5mL の精製水を加えてボルテックスで混合する。さらに 50 μ L (1/100 容量) の Exosome Binding Enhancer (100 \times) を添加し、ボルテックスミキサーで混合する。

1.5 mL マイクロチューブを用いた反応系（2 反応分）の場合の液量です。反応スケールを大きくする場合は PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit 付属の取扱説明書 表 2 に従いスケールアップさせてください。

4. 細胞外小胞結合磁気ビーズの調製

PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット付属の取扱説明書「2. 細胞外小胞の単離」に従って準備してください。

【反応フロー図】



【操作手順】

1. 工程フロー

工程		使用試薬・機器	時間
1.	細胞外小胞の単離	細胞外小胞の単離	>70 分間
		細胞外小胞の捕捉	
2.	透過処理 (本キットを使用)	① 透過処理液	>1 時間
		② ネガティブコントロール溶液	
	洗浄	WB (+Enhancer)	

以下の工程は、PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキットに従い実施する。

工程		使用試薬・機器	時間
3.	細胞外小胞の染色	蛍光標識アイソタイプコントロール抗体 もしくは 蛍光標識細胞外小胞マーカー検出用抗体	>1 時間
		洗浄	
4.	解析	解析	フローサイトメトリー機器

※ 透過処理工程では、各サンプルおよび検出条件ごとに透過処理液およびネガティブコントロール溶液をそれぞれ反応させてください

2. 操作方法（工程フロー「2. 透過処理」、1 種類の細胞外小胞マーカーを解析する場合）

- (1) PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキットの取扱説明書に従い、6 反応分の細胞外小胞磁気ビーズ（700 μL）を作製するため、「2. 細胞外小胞の単離」まで進める。
- (2) 300 μL の細胞外小胞結合磁気ビーズを 2 本のマイクロチューブに分注する。
- (3) マイクロチューブを遠心し、磁気ビーズをスピンドウンする。
- (4) 専用の磁気スタンドにマイクロチューブを 1 分間静置し、上清をピペットで除く。
- (5) 300 μL の WB (+Enhancer) をマイクロチューブに加え、ボルテックスで混和する。
- (6) (3)~(5)の作業を 2 回繰り返す。
- (7) 100μL の透過処理液または 100 μL のネガティブコントロール溶液を各々のチューブに添加し、ボルテックスで混和する。
- (8) (7)のマイクロチューブを室温に静置し、20 分後、40 分後のタイミングでボルテックスで混和し、計 1 時間かけてエクソソームを透過処理する。
- (9) (8) のマイクロチューブを遠心し、磁気ビーズをスピンドウンする。
- (10) 専用の磁気スタンドにマイクロチューブを 1 分間静置し、上清をピペットで除く。
- (11) 300 μL の WB (+Enhancer) をマイクロチューブに加え、ボルテックスで洗浄する。
- (12) (10)~(11)の洗浄を 2 回繰り返す。
- (13) 300 μL の WB (+Enhancer) をマイクロチューブに加え、ボルテックスで混和する。
- (14) 工程フロー「3.細胞外小胞の染色」からは、PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット取扱説明書に従い、「3.細胞外小胞の染色」の工程に進む

測定後の計算や解析方法については PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット取扱説明書をご確認ください。

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

2211.KAI01