FUJIFILM

Wako

Code No. 297-79201

For Genetic Research

PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD)

【1. Introduction】

Extracellular vesicles such as exosome have attracted attention as a messenger of cell-to-cell communication and a biomarker of diseases since they include proteins, mRNAs, microRNAs, and DNAs on their surface or inside and they are stably present in body fluids such as blood, urine, saliva, spinal fluid, and breast milk after being secreted from cells.

The kit includes reagents for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) available for a qualitative analysis of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant or samples from body fluid as well as a quantitative analysis of extracellular vesicles in samples of cell culture supernatant. It can detect extracellular vesicles, which have any surface marker protein, with high sensitivity by using a mouse monoclonal antibody against any surface marker protein of extracellular vesicles as a primary detection antibody and HRP-conjugated anti mouse IgG antibody of the kit as a secondary detection antibody after extracellular vesicles are captured by a plate on which proteins that specifically bind with phosphatidylserine (PS) on the surface of extracellular vesicles are immobilized. As a control primary detection antibody, anti human CD63 mouse monoclonal antibody is included in the kit. By using this, human CD63 positive extracellular vesicles can be detected.

This kit can easily detect surface marker proteins of extracellular vesicles purified from a sample with MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (Code No. 290-84103) with 50 to 1,000 times higher sensitivity than Western blot. Also, extracellular vesicles in samples of cell culture supernatant can be quantitatively measured by using extracellular vesicles purified from cell culture supernatant with MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 as a reference standard.

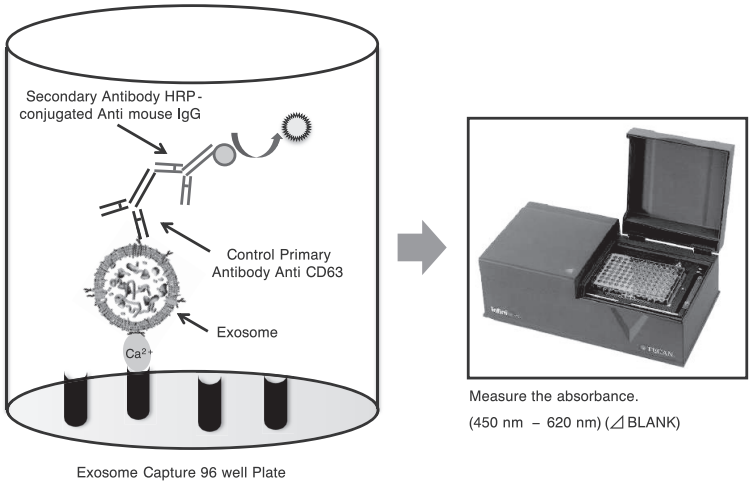


Fig. 1 Measurement principle

【2. Summary of the measuring method】

Diluted cell culture supernatant samples or samples of extracellular vesicles purified by MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 and diluted are incubated with stirring at room temperature for 2 hours in the wells of the Exosome Capture 96 Well Plate (PS binding protein immobilized microplate). After washing, add mouse monoclonal antibody against any surface marker protein of extracellular vesicles as a primary detection antibody or Control Primary Antibody Anti CD63 included with the kit and incubate that with stirring at room temperature for 1 hour. After washing, add Secondary Antibody HRP-conjugated Anti mouse IgG and incubate that with stirring at room temperature for 1 hour. After washing again, it is reacted with TMB Solution (coloring reagent) at room temperature for 30 minutes. Add Stop Solution and measure absorbance at 450 nm (reference wavelength 620 nm). Compare measurement values of each sample.

When the kit is used for a quantitative measurement, prepare a standard curve by using extracellular vesicles purified from samples with MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 as a reference standard (Protein concentration or particle numbers should be measured beforehand) and plotting absorbance values of the dilution series of the reference standard, to determine the concentration of the sample from the standard curve.

【3. Intended purpose】

(1) A qualitative analysis of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant or samples from body fluids

The kit enables us to conduct a highly sensitive qualitative analysis of any surface marker protein of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant or samples from body fluids with MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 by using a mouse monoclonal antibody against any surface marker protein of extracellular vesicles as a primary detection antibody.

(2) A quantitative analysis of extracellular vesicles in cell culture supernatant

Extracellular vesicles positive for any marker protein in cell culture supernatant can be quantitatively analyzed by using extracellular vesicles purified from cell culture supernatant with MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 as a reference standard and using a mouse monoclonal antibody against any surface marker protein of extracellular vesicles as a primary detection antibody.

Note : Although Control Primary Antibody Anti CD63 as a control primary detection antibody in the kit can detect human CD63, it cannot detect mouse, rat, and bovine CD63. When a surface marker protein other than human CD63 is required to be detected, use an appropriate mouse monoclonal antibody.

Note : Since Secondary Antibody HRP-conjugated Anti mouse IgG as a secondary detection antibody of the kit can strongly react non-specifically with mouse IgG in a sample and weakly react non-specifically with human IgG and rat IgG, a quantitative analysis of serum or plasma samples including these IgGs should be avoided.

【4. Reagent supplied】

Components	State	Amount
(A) Exosome Capture 96 Well Plate	Use after washing	8 well×12 strips/1 plate
(B) Plate Seal	−	4 sheets
(C) Reaction/Washing Buffer (10×)	Concentrated Use after pretreatment*	50 mL×2 vials
(D) Exosome Binding Enhancer (100×)	Concentrated Use after pretreatment*	10 mL×1 vial
(E) Control Primary Antibody Anti CD63 (100×)	Concentrated Use after pretreatment*	120 μL×1 vial
(F) Secondary Antibody HRP-conjugated Anti mouse IgG (100×)	Concentrated Use after pretreatment*	120 μL×1 vial
(G) TMB Solution	Ready for use	12 mL×1 vial
(H) Stop Solution	Ready for use	12 mL×1 vial
(I) Instruction Manual	−	1 copy

Note : each reagent should be prepared in accordance with section 10. Preparation of reagents.

【5. Storage and the expiration date of the kit】

Store the kit at 2-10℃ (Freezing is strictly prohibited). The kit is stable until the expiration date under the condition (The expiration date is printed on the label). Do not use expired reagents. Please use opened reagents as soon as possible since they may be affected by storage conditions.

【6. The storage method of each reagent when the kit is separately used】

(A) Exosome Capture 96 Well Plate

When the plate strip is separately used, the remained unused strips should be returned to a zip seal pack and stored at 2-10℃. The strips are stable until the expiration date.

(C) Reaction/Washing Buffer (10×)

After it is returned to a room temperature and required volume of the solution is dispensed, the remained solution should be stored at 2-10℃ with their caps tightened. The solution is stable until the expiration date.

(D) Exosome Binding Enhancer (100×)

After it is returned to a room temperature and required volume of the solution is dispensed, the remained solution should be stored at 2-10℃ with their caps tightened. The solution is stable until the expiration date.

(E) Control Primary Antibody Anti CD63 (100×)

After required volume of the solution is dispensed soon after taking out from a refrigerator, the remained solution should be stored at 2-10℃ with their caps tightened. The solution is stable until the expiration date.

(F) Secondary Antibody HRP-conjugated Anti mouse IgG (100×)

After required volume of the solution is dispensed soon after taking out from a refrigerator, the remained solution should be stored at 2-10℃ with their caps tightened. The solution is stable until the expiration date.

(G) TMB Solution

After required volume of the solution is dispensed soon after taking out from a refrigerator, the remained solution should be stored at 2-10℃ with their caps tightened. The solution is stable until the expiration date.

(H) Stop Solution

After required volume of the solution is dispensed soon after taking out from a refrigerator, the remained solution should be stored at 2-10℃ with their caps tightened. The solution is stable until the expiration date.

【7. Reagents required other than the kit】

☐ Primary detection antibody against any surface marker protein of extracellular vesicles (Except antibody for detection of human CD63)
～ Recommend products ～
Anti CD9, Monoclonal Antibody (1K) (Code No. 014-27763)
Anti CD9, Rat Monoclonal Antibody (77B) (Code No. 019-28173)
Anti CD81, Monoclonal Antibody (17B1) (Code No. 011-27773)
Anti CD81, Rat Monoclonal Antibody (9B) (Code No. 010-28223)

☐ MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (Code No. 290-84103) (When a reference standard is prepared)

【8. Equipment and materials required other than the kit】

☐ Use as a check box
☐ Test tubes for dilution of sample and antibody
☐ Glassware for preparation of Reaction/Washing Buffer (Graduated cylinder)
☐ Micropipette
☐ Syringe-type repeating dispenser such as Eppendorf multipette or ThermoFisher Finnpipette (If available)
☐ Disposable reservoir (As necessary)
☐ Paper towel to remove the remained solution in wells.
☐ A vortex-type mixer
☐ A shaker for 96 well-plate (500 rpm)
Recommended products : Code No. 623-05671 MS 3 digital
Recommended products : Code No. 627-05691 MS 3 basic
☐ An automatic washer for 96 well-plate (If available)
Recommended products : Code No. 510-22411 HydroFlex™ M8Ch2
☐ A 96 well-plate reader (Required wavelength is 450 nm ± 10 nm and 600-650 nm)
Recommended products : Code No. 518-84231 Infinite® F50R [450 nm, 620 nm]
☐ Software for data analysis

【9. Preparation of a reference standard of an extracellular vesicle (When a quantitative measurement is conducted)】

Purify extracellular vesicles from a sample with MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 in accordance with the instruction manual. In regard to the purified extracellular vesicles, protein concentration shall be measured with such as BCA method or particle numbers shall be measured by Nanoparticle Tracking Analysis (by using such as NanoSight LM-10)※1. Purified extracellular vesicles should be refrigerated※2.

※1 Conduct each measurement in accordance with an appropriate protocol.
※2 Since responsiveness of extracellular vesicles tends to be weakened by freezing and thawing, refrigeration storage is recommended.

【10. Preparation of reagents】

Reagents described as "Ready for use" in【4. Reagent supplied】can be used as it is after it is returned to a room temperature. Reagents described as "Concentrated and use after pretreatment" shall be prepared as follows. Only required amount of each reagent shall be prepared at the time of use.

Preparation of the Reaction/Washing Buffer (1×)

After Reaction/Washing Buffer (10×)※3 is diluted 10-fold with purified water (distilled water), which has been returned to a room temperature, add 1/100 volume of Exosome Binding Enhancer (100×) to the diluted solution※4 and mix them well※5.

※ 3 Since ingredients of Reaction/Washing Buffer (10×) may be deposited by refrigeration storage, after returning that to a room temperature, check no presence of deposition before use.
※ 4 Be sure to add Exosome Binding Enhancer (100×) since it is an essential ingredient for extracellular vesicles to bind with a plate.
※ 5 Since ingredients of the Reaction/Washing Buffer (1×) tend to be deposited after addition of Exosome Binding Enhancer (100×), please use it within 8 hours after preparation.

(e.g.) When solution for 96-well reactions is prepared
After adding 900 mL of purified water (distilled water) to 100 mL of Reaction/Washing Buffer (10×) to make 1000 mL, add 10 mL of Exosome Binding Enhancer (100×) and mix them well.

Preparation of the reaction solution for anti CD63 antibody as a control detection antibody (When human CD63 is measured as a surface antigen)
Add 1/100 volume of Control Primary Antibody Anti CD63 (100 ×) to Reaction/Washing Buffer (1×) and mix them well.

(e.g.) When solution for 96-well reactions is prepared
Add 100 μL of Control Primary Antibody Anti CD63 (100×) to 10 mL of Reaction/Washing Buffer (1×) and mix them well.

Preparation of the reaction solution for a primary detection antibody (When a surface antigen other than human CD63 is measured)
Dilute mouse monoclonal antibody against any surface protein of extracellular vesicles with Reaction/Washing Buffer (1×)※6 to an appropriate concentration. A rough standard of the antibody concentration in a reaction solution for a primary detection antibody is 200-500 ng/mL.

(e.g.) When the reaction solution for a primary detection antibody (250 ng/mL) is prepared for 96-well reactions from the primary detection antibody (1 mg/mL)
To prepare 40-fold dilution, add 195 μL of Reaction/Washing Buffer (1×) to 5 μL of the primary detection antibody (1 mg/mL) and mix them. Then add 100 μL of the 40-fold dilution to 9.9 mL of Reaction/Washing Buffer (1×) and mix them well.

Preparation of the reaction solution for a secondary detection antibody
Add 1/100 volume of Secondary Antibody HRP-conjugated Anti mouse IgG (100×) to Reaction/Washing Buffer (1×)※6 and mix well.

(e.g.) When it is used for all 96 wells
Add 100 μL of Secondary Antibody HRP-conjugated Anti-mouse IgG (100×) to 10 mL of Reaction/Washing Buffer (1×) and mix them well.

Preparation of the dilution series of a reference standard of extracellular vesicles for preparation of a standard curve (When a quantitative measurement is conducted)
Dilute a reference standard of extracellular vesicles prepared in【9. Preparation of a reference standard of an extracellular vesicle】to an appropriate concentration with Reaction/Washing Buffer (1×)※6 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 0.1-3.0.

(e.g.) Regarding a reference standard of extracellular vesicles (Protein concentration is 20 μg/mL) : when 7 steps of 2-fold serial dilution are prepared

from 20 ng/mL of a reference standard of extracellular vesicles.

1) Prepare a 10-fold dilution (2000 ng/mL) of a reference standard of extracellular vesicles by mixing 5 μL of the reference standard of extracellular vesicles (20 μg/mL) with 45 μL of Reaction/Washing Buffer (1×).
2) Mix a reference standard of extracellular vesicles with Reaction/Washing Buffer (1×) in accordance with the following table to prepare 7 steps of 2-fold serial dilution from 20 ng/mL.

Concentration of standard solution (ng/mL)	Volume of standard solution	Reaction/Washing Buffer (1×)
20.0	10-Fold Dilution (2000 ng/mL) : 5 μL	495 μL
10.0	Standard solution (20.0 ng/mL) : 250 μL	250 μL
5.00	Standard solution (10.0 ng/mL) : 250 μL	250 μL
2.50	Standard solution (5.0 ng/mL) : 250 μL	250 μL
1.25	Standard solution (2.5 ng/mL) : 250 μL	250 μL
0.625	Standard solution (1.25 ng/mL) : 250 μL	250 μL
0.313	Standard solution (0.625 ng/mL) : 250 μL	250 μL
0.00 (Blank)	–	250 μL

【11. Dilution of samples】

Dilute samples with Reaction/Washing Buffer (1×)※6 using a tube, etc. so that absorbance at 450 nm for ELISA (value obtained by subtracting the absorbance at a secondary wavelength of 620 nm) falls in the range between 0.2 to 2.5. Also, when measuring undiluted samples, please add 1/100 volume of Exosome Binding Enhancer (100×) to them.

※6 Dilute a primary detection antibody, a secondary detection antibody, a reference standard of extracellular vesicles, and samples with Reaction/Washing Buffer (1×) containing Exosome Binding Enhancer prepared in【6. The storage method of each reagent when the kit is separately used】. In other cases, there is also the possibility that using a TBS buffer containing BSA (Final concentration : 1 w/v %) and Exosome Binding Enhancer (Final concentration : 1×) may decrease background and increase responsiveness. Since ingredients of PBS-based buffer are deposited after addition of Exosome Binding Enhancer (100×), please do NOT use it.

【12. Operating method】

In advance of following each washing step, prepare the reagents to be dispensed next in accordance with【6. The storage method of each reagent when the kit is separately used】.

1) Wash each well of Exosome Capture 96 Well Plate (strips to be used) with 300-350 μL of Reaction/Washing Buffer (1×) 3 times※7. Then, wipe off the remained fluid in the wells by turning the plate upside down and gently tapping it on a folded paper towel.
2) Dispense 100 μL of sample dilution, standard dilution (When quantitative analysis is conducted), or Reaction/Washing Buffer (1×) as a blank in each well.
3) Label a plate seal※8 and react them by stirring at about 500 rpm using a microplate shaker at room temperature (20-25℃) for 2 hours※9.
4) After reaction, remove the reaction solution and wash each well with 300-350 μL of Reaction/Washing Buffer (1×) 3 times. Then, wipe off the remained fluid in the wells by turning the plate upside down and gently tapping it on a folded paper towel.
5) Dispense 100 μL of either anti CD63 antibody reaction solution or any primary detection antibody reaction solution in each well.
6) Label a plate seal※8 and react them by stirring at about 500 rpm using a microplate shaker at room temperature (20-25℃) for 1 hour※9.

7) After reaction, remove the reaction solution and wash each well with 300-350 μL of Reaction/Washing Buffer (1×) 3 times. Then, wipe off the remained fluid in the wells by turning the plate upside down and gently tapping it on a folded paper towel.
8) Dispense 100 μL of the secondary detection antibody reaction solution in each well.
9) Label a plate seal※8 and react them by stirring at about 500 rpm using a microplate shaker at room temperature (20 to 25℃) for 1 hour※9.
10) After reaction, remove the reaction solution and wash each well with 300 to 350 μL of Reaction/Washing Buffer (1×) 5 times. Then, wipe off remained fluid in the wells by turning the plate upside down and gently tapping it on a folded paper towel.
11) Dispense 100 μL of TMB Solution, which is returned to a room temperature, in each well and stir them with a microplate shaker for about 1 minute.
12) Label a plate seal※8 and react them by standing at room temperature (20-25℃) for 30 minutes.
13) Add 100 μL of Stop Solution, which is returned to a room temperature, in each well.
14) After the plate is stirred using a microplate shaker for about 5 seconds, measure the absorbance at 450 nm and 620 nm※10 with a 96-well microplate reader.

※7 Deposits may be observed on surface of a plate. It does not affect quality of a product.
※8 When a plate strip is separately used, cut a plate seal into a size of the strip for use.
※9 Since detection sensitivity becomes lower under the condition of standing and the error between wells tends to become larger, reaction by stirring at about 500 rpm using a rotary microplate shaker is recommended.
※10 When the absorbance at 620 nm cannot be measured, measure it at a wavelength in the range of 620-650 nm.

【13. Calculation】

In the following calculation, use the value of 450 nm by subtracting the absorbance value of 620 nm (600-650 nm) from the absorbance value of 450 nm.

〈Qualitative measurement〉

Calculate the value by subtracting the absorbance value of blank (450 nm) from the absorbance value of diluted samples (450 nm) and compare the values between samples.

〈Quantitative measurement〉

1) Calculate the value by subtracting the absorbance value of blank (450 nm) from the absorbance value of a diluted sample (450 nm)※11. …An absorbance value of a diluted sample
2) Calculate the value by subtracting the absorbance value of blank (450 nm) from the absorbance values of the dilution series of the reference standard (450 nm). …An absorbance value of a reference standard
3) Plot the concentration of the reference standard on the horizontal axis and its absorbance value on the vertical axis to prepare a standard curve※12.
4) Read a concentration value corresponding to an absorbance value of a diluted sample with the standard curve※13. Multiply the dilution ratio of the sample and the read concentration together to determine the measurement.

※11 When an absorbance value of a diluted sample is deviated from the range of a standard absorbance curve, measure it again after diluting it with an appropriate scale.
※12 Prepare a standard curve for each measurement.
※13 Usage of a third-degree polynomial with 4 or 5 parameters is recommended for computer software processing.

【14. Reference data on performance of the kit】

■1 Qualitative analysis of extracellular vesicles purified from various cell culture supernatants

Add 1 ng of extracellular vesicles purified from a various cell culture supernatant to a well and surface marker levels were compared by a qualitative analysis with the kit using a primary detection antibody, which recognized cell surface markers, CD9, CD63, or CD81 each. Also, as reference comparative data, 150 ng of extracellular vesicles purified from a various cell culture supernatant was electrophoresed and protein levels of each surface markers were detected by Western blot using a primary detection antibody, which recognized cell surface markers, CD9, CD63, or CD81 each. Then, qualitative analysis was conducted.

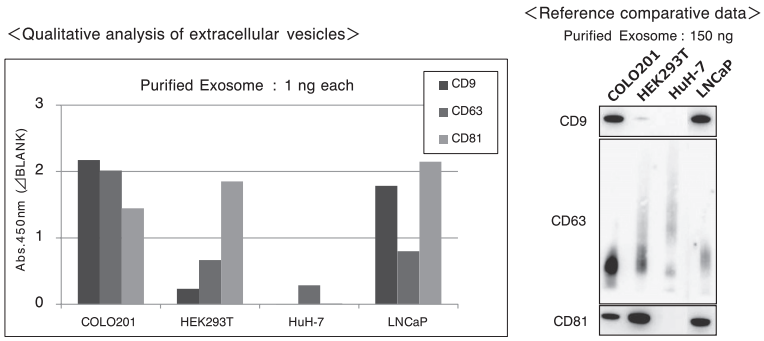


Fig. 2 Qualitative analysis of extracellular vesicles purified from various cell culture supernatants

■2 Qualitative analysis of extracellular vesicles purified from healthy human serum

40, 20, or 10 ng of extracellular vesicles purified from 6 healthy human serum samples were added to each well and qualitative analysis was conducted using a control primary detection antibody which recognized the cell surface marker CD63.

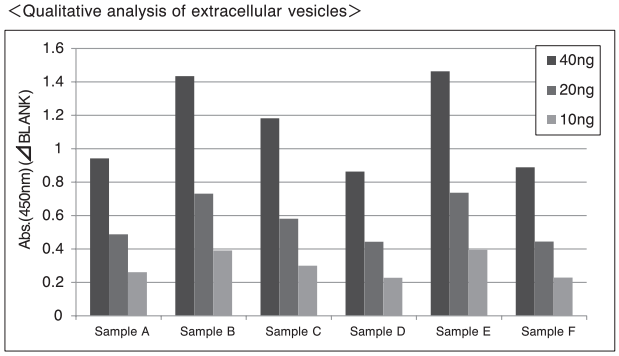
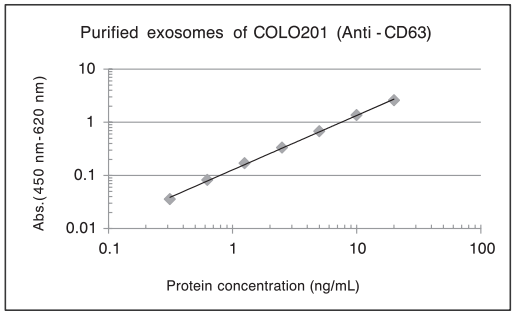


Fig. 3 Qualitative analysis of extracellular vesicles purified from healthy human serum

3 Reference data : Standard curve of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant

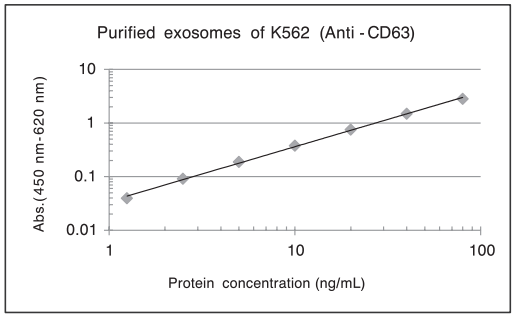
An example of a standard curve of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO 201 cells (Detected by anti CD63 antibody)

Concentration (ng/mL)	Abs. (450 nm-620 nm)			
	1	2	Mean	⊿Blank
0	0.051	0.0522	0.0516	−
0.3125	0.0859	0.0882	0.0871	0.0355
0.625	0.132	0.1339	0.1330	0.0814
1.25	0.2198	0.2217	0.2208	0.1692
2.5	0.3812	0.382	0.3816	0.3300
5	0.7137	0.7307	0.7222	0.6706
10	1.4068	1.406	1.4064	1.3548
20	2.6552	2.6261	2.6407	2.5891



An example of a standard curve of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of K562 cells (Detected by anti CD63 antibody)

Concentration (ng/mL)	Abs. (450 nm-620 nm)			
	1	2	Mean	⊿Blank
0	0.0462	0.0528	0.0495	−
1.25	0.0870	0.0911	0.0891	0.0396
2.5	0.1360	0.1446	0.1403	0.0908
5	0.2355	0.2387	0.2371	0.1876
10	0.4320	0.4205	0.4263	0.3768
20	0.8192	0.7850	0.8021	0.7526
40	1.5618	1.5124	1.5371	1.4876
80	2.9187	2.8005	2.8596	2.8101



■4 Reference data : Detection sensitivity of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant

Detection sensitivity of extracellular vesicles purified from each sample of cell culture supernatant by the assay (Detected by anti CD63 antibody)

	Detection limit (Blank + 3.3SD)	Determination limit (Blank + 10SD)
Purified exosomes of COLO201	0.11 ng/mL (11 pg)	0.34 ng/mL (34 pg)
Purified exosomes of K562	0.50 ng/mL (50 pg)	1.34 ng/mL (134 pg)

〈**Reference comparative data**〉

Detection sensitivity of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells by Western blot (Detected by anti CD63 antibody)

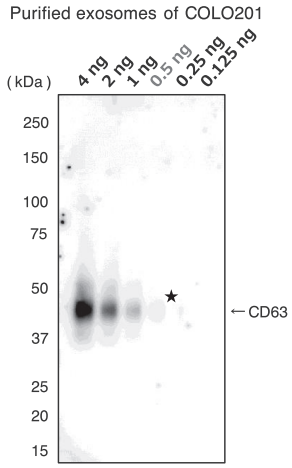


Fig. 4 Result of Western blot analysis

sample : extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells with MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2

★ : Detection limit

■5 Reference data : Precision of the quantitative analysis of cell culture supernatant samples

Intra-assay error (Detected by anti CD63 antibody)

A standard curve was prepared using extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells and K562 cells as a standard. Then concentrations of 4-step dilution samples of cell culture supernatant of K562 cells (1 : 100 to 1 : 800) and 4-step dilution samples of cell culture supernatant of COLO201 cells (1 : 200 to 1 : 1600) were measured (n = 6) and CV (%) of measurement values were calculated.

Cell culture sup. of COLO201 (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)									
	1	2	3	4	5	6	Mean	SD	CV (%)	
1 : 1600	1.18	1.17	1.16	1.17	1.15	1.14	1.16	0.01	1.3	0.7
1 : 800	2.31	2.32	2.32	2.30	2.31	2.32	2.31	0.01	0.4	
1 : 400	4.82	4.78	4.77	4.78	4.81	4.78	4.79	0.02	0.4	
1 : 200	9.94	9.89	9.76	9.85	9.77	9.96	9.86	0.09	0.9	

Cell culture sup. of K562 (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)									
	1	2	3	4	5	6	Mean	SD	CV (%)	
1 : 800	3.93	3.88	3.88	3.83	3.78	3.86	3.86	0.05	1.3	2.0
1 : 400	7.71	7.82	7.64	7.64	7.48	7.46	7.62	0.13	1.8	
1 : 200	15.47	14.89	15.32	15.32	14.85	14.69	15.09	0.32	2.1	
1 : 100	32.03	31.77	31.21	31.59	30.31	30.03	31.16	0.82	2.6	

Inter-assay error (Detected by anti CD63 antibody)

A standard curve was prepared using extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells and K562 cells as a standard. Then concentrations of 4-step dilution samples of cell culture supernatant of K562 cells (1 : 100 to 1 : 800) and 4-step dilution samples of cell culture supernatant of COLO201 cells (1 : 200 to 1 : 1600) were measured by 3 different assays and CV (%) of measurement values were calculated.

Cell culture sup. of COLO201 (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)						
	1	2	3	Mean	SD	CV (%)	
1 : 1600	1.09	1.07	1.12	1.09	0.02	2.1	1.8
1 : 800	2.13	2.13	2.19	2.15	0.03	1.6	
1 : 400	4.26	4.39	4.42	4.36	0.09	2.0	
1 : 200	8.65	8.80	8.96	8.81	0.16	1.8	

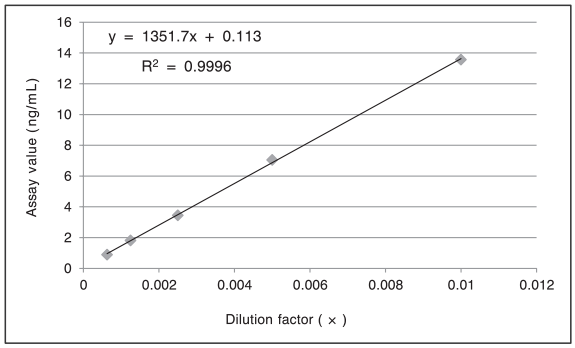
Cell culture sup. of K562 (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)						
	1	2	3	Mean	SD	CV (%)	
1 : 800	3.10	3.30	4.09	3.50	0.52	15.0	8.9
1 : 400	6.53	6.76	7.45	6.91	0.48	6.9	
1 : 200	13.44	14.53	15.27	14.41	0.92	6.4	
1 : 100	27.09	29.19	31.34	29.21	2.12	7.3	

■ 6 Reference data : Dilution linearity of cell culture supernatant samples

A standard curve was prepared using extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells and K562 cells as a standard. Then dilution linearity of 5-step dilution samples of cell culture supernatant of COLO201 cells (1 : 100 to 1 : 1600) and 5-step dilution samples of cell culture supernatant of K562 cells (1 : 50 to 1 : 800) was evaluated.

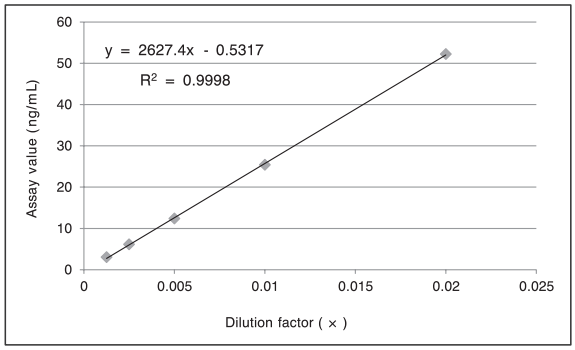
Dilution linearity of cell culture supernatant samples of COLO201 cells (Detected by anti CD63 antibody)

Dilution		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Ratio	Factor (×)			
1 : 1600	0.000625	0.89	0.91	98.4
1 : 800	0.00125	1.82	1.72	105.6
1 : 400	0.0025	3.44	3.52	97.8
1 : 200	0.005	7.04	6.78	103.9
1 : 100	0.01	13.6	–	–



Dilution linearity of cell culture supernatant samples of K562 cells (Detected by anti CD63 antibody)

Dilution		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Ratio	Factor (×)			
1 : 800	0.00125	3.02	3.07	98.2
1 : 400	0.0025	6.15	6.19	99.3
1 : 200	0.005	12.4	12.7	97.5
1 : 100	0.01	25.4	26.1	97.2
1 : 50	0.02	52.2	–	–



■7 Reference data : Spike and Recovery test with cell culture supernatant samples

Spike and Recovery on 1 : 400 diluted cell culture supernatant samples of COLO201 cells

Three concentrations (2.5, 5, 10 ng/mL) of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells were added to 1 : 400 diluted samples of cell culture supernatant of COLO201 cells and concentrations of samples were measured to calculate the recovery rate.

Diluted samples of cell culture supernatant of COLO201 (1 : 400)

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate (%)	
–	4.23	–	–	
2.5	7.03	2.81	112.2	104
5.0	9.19	4.96	99.2	
10.0	14.3	10.1	100.5	

Spike and Recovery on 1 : 200 diluted cell culture supernatant samples of K562 cells

Three concentrations (10, 20, 40 ng/mL) of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of K562 cells were added to 1 : 200 diluted samples of cell culture supernatant of K562 cells and concentrations of samples were measured to calculate the recovery rate.

Diluted samples of cell culture supernatant of K562 (1 : 200)

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate (%)	
–	14.3	–	–	
10.0	24.6	10.3	103.0	99
20.0	33.8	19.5	97.5	
40.0	53.4	39.1	97.8	

【15. Precautions】

- Wear gloves, glasses, and laboratory coats when handling the assay materials.
- Be careful not to allow the reagent solutions of the kit to touch the skin, eyes and mucus membranes. In case of contact with these, wash skin/eyes thoroughly with water and seek medical attention when necessary.
- In treating assay samples of human or animal origin, be careful for possible biohazards. This kit contains components of animal origin. These materials should be handled as potentially infectious.
- 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 consumable and unused component in accordance with applicable regional/national regulatory requirements.
- In order to avoid dryness of wells, contamination of foreign substances, bias of temperature, and evaporation of dispensed reagents during incubation, never forget to label a plate seal.
- ELISA can be easily affected by the laboratory environment. Follow the operating method and temperature in the laboratory and in the incubator should be strictly maintained at 20-25℃ . In addition, avoid airstream velocity over 0.4 m/sec including wind from an air conditioner and humidity less than 30%.
- Measurements should be conducted considering cross contamination between wells.

【16. References】

1) W. Nakai, *et al*., *Sci. Rep*., **6**, 33935 (2016).
2) A. Kraft, W81 Award. (2017).
3) S. Osawa, *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun*., **488**, 232-238 (2017).
4) S. Nagashima, *et al., J. Virol*., **91** (22), e00822-17 (2017).
5) T. Yoshida, *et al., Curr. Protoc. Cell Biol*., **77** (1), 3.45.1-3.45.18 (2017).
6) S. Saito, *et al., Sci. Rep*., **8**, 3997 (2018).
7) H. Kobayashi, *et al., Nagoya J. Med. Sci*., **80** (2), 141-153 (2018).
8) Y. Obata, *et al., JCI Insight*, **3** (8), e99680 (2018).
9) R.C. Middleton, *et al., J. Extracell. Vesicles*, **7** (1), 1456888 (2018).
10) H. Kawahara, and R. Hanayama, *Biol. Pharm. Bull*., **41**, 1119-1125 (2018).
11) M. Santiana, *et al., Cell Host & Microbe*, **24**, 208-220 (2018).
12) T. Antes, *et al., J. Nanobiotechnol*., **16**, 61 (2018).
13) H. Kimura, *et al., Clinical Cancer Research*, **25** (6), 1936-1947 (2019).
14) G. Gorji-Bahri, *et al., Current Gene Therapy*, **18**, 336-350 (2018).
15) H. Xu, *et al*., *Anal. Chem*., **90** (22), 13451-13458 (2018).
16) H. Kuroda, *et al., Mol Pharm*., **16**, 292-304 (2019).
17) J. Juan, *et al., Stem. Cell Res. Ther*., **10** (1), 95 (2019).
18) L. Zhi, *et al., Cell Death Discovery*, **5**, 79 (2019).
19) G.K. Patel *et al., Sci Rep*., **9** (1), 5335 (2019).
20) Y.L. Tai *et al., J. Biomed. Sci*. **26** (1), 35 (2019).
21) Y. Sugihara *et al., PLoS One*., **14** (5), e0217394 (2019).

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://ffwk.fujifilm.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 : + 49-2131-311100
http://www.wako-chemicals.de

コードNo. 297-79201

遺伝子研究用

PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD)

【1. はじめに】

エクソソームに代表される細胞外小胞は、表面または内部にタンパク質、mRNA、microRNA、DNA などを含み、細胞から分泌された後、血液、尿、唾液、髄液、母乳などの体液中で安定的に存在していることから、細胞間コミュニケーションのメッセンジャーや疾患のバイオマーカーとして注目を集めています。

本キットは、細胞培養上清や体液検体から精製した細胞外小胞の定性解析、および細胞培養上清検体中の細胞外小胞の定量解析に利用できる酵素免疫測定試薬です。細胞外小胞表面のホスファチジルセリン（PS）特異的に結合するタンパク質を固相化したプレートに細胞外小胞を反応させて固定化した後、任意の細胞外小胞表面マーカータンパク質に対するマウスモノクローナル抗体を検出一次抗体に、キットの HRP 標識抗マウス IgG 抗体を検出二次抗体に用いることで、任意のマーカータンパク質を表面に有する細胞外小胞を高感度に検出することができます。キットにはコントロール検出一次抗体として抗ヒト CD63 マウスモノクローナル抗体が含まれており、これを用いることでヒト CD63 陽性細胞外小胞を検出することができます。

本キットを用いることで細胞培養上清および体液検体から MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2（Code No. 290-84103）を用いて精製した細胞外小胞の表面マーカータンパク質をウェスタンブロットよりも 50 ～ 1,000 倍程度高い感度で簡便に検出することができます。また、細胞培養上清から MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 を用いて精製した細胞外小胞を標準品に用いることで、細胞培養上清検体中の細胞外小胞を定量的に測定することができます。

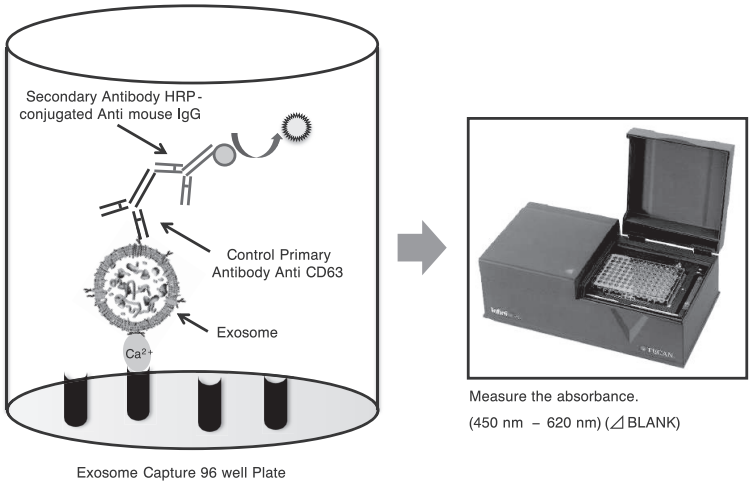


Fig. 1 Measurement principle

【2. 測定方法の概要】

希釈された細胞培養上清検体あるいは、MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 を用いて精製希釈した細胞外小胞試料を、Exosome Capture 96 Well Plate（PS 結合タンパク質固相化マイクロプレート）ウエルに加え、ウエル中で撹拌しながら室温で 2 時間インキュベートします。洗浄後、検出用一次抗体反応液として任意の細胞外小胞表面マーカータンパク質に対するマウスモノクローナル抗体またはキット付属の Control Primary Antibody Anti CD63 反応液を加え、撹拌しながら室温で 1 時間インキュベートします。洗浄後、検出用二次抗体反応液として Secondary Antibody HRP-conjugated Anti mouse IgG を加え、撹拌しながら室温で 1 時間インキュベートします。再び洗浄した後、TMB Solution（発色試薬）と室温で 30 分間反応させ、Stop Solution を加えた後、450nm（副波長 620nm）の吸光度を測定します。測定後、各検体の測定値を比較して下さい。

本キットを定量測定に利用する場合は、検体から MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 を用いて精製した細胞外小胞（事前にタンパク質濃度または粒子数を測定しておく）を標準品に用いて、その標準品希釈系列に対して吸光度をプロットすることで標準曲線を作成し、この標準曲線から検体中の濃度を決定します。

【3. 用　途】

(1) 細胞培養上清および体液検体から精製した細胞外小胞の定性解析
　任意の細胞外小胞表面マーカータンパク質に対するマウスモノクローナル抗体を検出一次抗体に用いることで、細胞培養上清や体液検体から MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 を用いて精製した細胞外小胞の表面マーカータンパク質の定性解析を高感度に行うことができます。

(2) 細胞培養上清検体中の細胞外小胞の定量解析
　細胞培養上清から MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 を用いて精製した細胞外小胞を標準品に用い、任意の細胞外小胞表面マーカータンパク質に対するマウスモノクローナル抗体を検出一次抗体に用いることで、細胞培養上清検体中の任意のマーカータンパク質陽性細胞外小胞を定量することができます。

※キットのコントロール検出一次抗体である Control Primary Antibody Anti CD63 はヒト CD63 を検出できますが、マウス、ラット、ウシ CD63 は検出できません。ヒト CD63 以外の表面マーカータンパク質を検出したい場合は適切なマウスモノクローナル抗体をご使用下さい。

※キットの検出二次抗体である Secondary Antibody HRP-conjugated Anti mouse IgG は検体中のマウス IgG に強く非特異反応し、ヒト IgG、ラット IgG に弱く非特異反応するため、これらの IgG を含む血清や血漿などの検体の定量解析はお控え下さい。

【4. 構成品】

構 成 品	状　態	容　量
(A) Exosome Capture 96 Well Plate	洗浄後使用	8well×12strips/1 枚
(B) Plate Seal	−	4 枚
(C) Reaction/Washing Buffer (10×)	調製後使用	50mL×2 本
(D) Exosome Binding Enhancer (100×)	調製後使用	10mL×1 本
(E) Control Primary Antibody Anti CD63 (100×)	調製後使用	120 μL×1 本
(F) Secondary Antibody HRP-conjugated Anti mouse IgG (100×)	調製後使用	120 μL×1 本
(G) TMB Solution	そのまま使用	12mL×1 本
(H) Stop Solution	そのまま使用	12mL×1 本
(I) 取扱説明書	−	1 部

【5. キットの保存と使用期限】
キットは 2 ～ 10℃で保存して下さい（凍結厳禁）。この保存条件下でキットは有効期限までは安定です（有効期限はラベルに記載）。有効期限の過ぎた試薬は使用しないで下さい。開封した各試薬は、保管状態により影響を受ける可能性がありますので早めのご使用を推奨します。

【6. キットを分割使用する場合の各構成試薬の保存方法】
（A）Exosome Capture 96 Well Plate
プレートストリップを分割して使用する場合、残りの未使用のストリップはジップシールパックに戻し、そのまま 2 ～ 10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。
（C）Reaction/Washing Buffer（10×）
室温に戻して必要量の溶液を分注した後、残りの溶液は蓋をしっかりと閉め、2 ～ 10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。
（D）Exosome Binding Enhancer（100×）
室温に戻して必要量の溶液を分注した後、残りの溶液は蓋をしっかりと閉め、2 ～ 10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。
（E）Control Primary Antibody Anti CD63（100×）
冷蔵庫から取り出してすぐに必要量の溶液を分注した後、残りの溶液は蓋をしっかりと閉め、2 ～ 10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。
（F）Secondary Antibody HRP-conjugated Anti mouse IgG（100×）
冷蔵庫から取り出してすぐに必要量の溶液を分注した後、残りの溶液は蓋をしっかりと閉め、2 ～ 10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。
（G）TMB Solution
冷蔵庫から取り出してすぐに必要量の溶液を分注した後、残りの溶液は蓋をしっかりと閉め、2 ～ 10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。
（H）Stop Solution
冷蔵庫から取り出してすぐに必要量の溶液を分注した後、残りの溶液は蓋をしっかりと閉め、2 ～ 10℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

【7. キット以外に必要な試薬】
□ 任意の細胞外小胞表面マーカー検出用一次抗体（ヒト CD63 検出用抗体以外）推奨品
Anti CD9, Monoclonal Antibody（1K）（Code No. 014-27763）
Anti CD9, Rat Monoclonal Antibody（77B）（Code No. 019-28173）
Anti CD81, Monoclonal Antibody（17B1）（Code No. 011-27773）
Anti CD81, Rat Monoclonal Antibody（9B）（Code No. 010-28223）
□ MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2（Code No. 290-84103）（標準品を作製する場合）

【8. 必要な器具】
□ チェックリスト
□ 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

推奨品：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 Infinite® F50R［450nm, 620nm］
□ データ解析用ソフトウェア
推奨品：Code No. 290-34631 PLATEmanager® V5/I PC SET

【9. 細胞外小胞標準品の作製（定量測定を行う場合）】
MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 を用いて、キット取扱説明書に従って、検体から細胞外小胞を精製して下さい。精製した細胞外小胞は BCA 法などによりタンパク質濃度を測定するか、ナノトラッキング解析法（ナノサイト LM-10 など使用）により粒子数を測定して下さい※1。精製した細胞外小胞は冷蔵で保管して下さい※2。
※1 各測定は適切なプロトコールに従って行って下さい。
※2 細胞外小胞は凍結融解により反応性が低下する傾向がありますので、冷蔵で保管することをお薦めします。

【10. 試薬の調製】
【4. 構成品】で「そのまま使用」とある試薬は室温に戻した後、そのままの状態で使用できます。「調製後使用」とあるものについては下記の要領で調製して下さい。各試薬は測定に必要な分だけ用時調製して下さい。

反応 / 洗浄液（1×）の調製
Reaction/Washing Buffer（10×）※3 を室温に戻した精製水（蒸留水）で 10 倍に希釈した後、希釈液に対して 1/100 量の Exosome Binding Enhancer（100×）※4 を添加してから、よく混合して下さい※5。
※3 Reaction/Washing Buffer（10×）は冷蔵保管で成分が析出している可能性があるので、室温に戻した後、析出物がないことを確認してから使用して下さい。
※4 Exosome Binding Enhancer（100×）は細胞外小胞がプレートに結合するための必須成分であるため必ず添加して下さい。
※5 Exosome Binding Enhancer（100×）を添加した反応 / 洗浄液（1×）は成分が析出しやすいので、調製後 8 時間以内にご使用下さい。

（例）96 ウエル反応分を調製する場合
100mL の Reaction/Washing Buffer（10×）に 900mL の精製水（蒸留水）を加え 1,000mL とした後、10mL の Exosome Binding Enhancer（100×）を添加してからよく混合する。

検出用コントロール抗 CD63 抗体反応液の調製（表面抗原としてヒト CD63 を測定する場合）
反応 / 洗浄液（1×）に対して 1/100 量の Control Primary Antibody Anti CD63（100×）を添加して、よく混合して下さい。

（例）96 ウエル反応分を調製する場合
10mL の反応 / 洗浄液（1×）に 100 μL の Control Primary Antibody Anti CD63（100×）を添加してよく混合する。

検出用一次抗体反応液の調製（ヒト CD63 以外の表面抗原を測定する場合）
任意の細胞外小胞表面タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体を反応 / 洗浄液（1×）※6 で適切な濃度に希釈して下さい。検出用一次抗体反応液の抗体濃度の目安は 200 ～ 500ng/mL です。

（例）検出用一次抗体（1mg/mL）から検出用一次抗体反応液（250ng/mL）を 96 ウエル反応分調製する場合
5 μL の検出用一次抗体（1mg/mL）に 195 μL の反応 / 洗浄液（1×）を添加混

合し、40 倍希釈液を作製する。その後 9.9mL の反応 / 洗浄液（1×）に 100 μL の 40 倍希釈液を添加してよく混合する。

検出用二次抗体反応液の調製
反応 / 洗浄液（1×）※6 に対して 1/100 量の Secondary Antibody HRP-conjugated Anti mouse IgG（100×）を添加して、よく混合して下さい。

（例）96 ウエル全てを使用する場合
10mL の反応 / 洗浄液（1×）に 100 μL の Secondary Antibody HRP-conjugated Anti mouse IgG（100×）を添加してよく混合する。

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）
【9. 細胞外小胞標準品の作製（定量測定を行う場合）】で作製した細胞外小胞標準品を ELISA 測定の 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、反応 / 洗浄液（1×）※6 を用いて適切な濃度に希釈して下さい。

（例）細胞外小胞標準品（タンパク質濃度 20 μg/mL）について、20ng/mL から 7 段階の 2 倍希釈系列を調製する場合
1）細胞外小胞標準品（20 μg/mL）5 μL と反応 / 洗浄液（1×）45 μL を混合し、細胞外小胞標準品 10 倍希釈液（2000ng/mL）を調製する。
2）下記の表のような割合で反応 / 洗浄液（1×）と混合し、20ng/mL から 7 段階の 2 倍希釈系列を調製する。

標準溶液濃度（ng/mL）	標準溶液の容量	反応 / 洗浄液（1×）
20.0	10 倍希釈液（2000ng/mL）：5 μL	495 μL
10.0	20.0ng/mL の標準溶液：250 μL	250 μL
5.00	10.0ng/mL の標準溶液：250 μL	250 μL
2.50	5.00ng/mL の標準溶液：250 μL	250 μL
1.25	2.50ng/mL の標準溶液：250 μL	250 μL
0.625	1.25ng/mL の標準溶液：250 μL	250 μL
0.313	0.625ng/mL の標準溶液：250 μL	250 μL
0.00（Blank）	−	250 μL

【11. 検体の希釈】
ELISA 測定の 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反応 / 洗浄液（1×）※6 で希釈して下さい。また、検体を希釈せずに測定する場合は、Exosome Binding Enhancer（100×）を 1×となるように添加して下さい。

※6 検出用一次抗体、検出用二次抗体、細胞外小胞標準品および検体の希釈には【6. キットを分割使用する場合の各構成試薬の保存方法】で調製した Exosome Binding Enhancer 添加済みの反応 / 洗浄液（1 ×）を用いて下さい。その他、TBS に BSA を終濃度 1w/v%、Exosome Binding Enhancer を 1 ×となるように添加した溶液を用いることでバックグラウンドを下げ、反応性を上げられる場合もあります。PBS ベースの溶液に Exosome Binding Enhancer を添加すると析出物が生じるため絶対に用いないで下さい。

【12. 操作法】
下記の各洗浄ステップを始める前に次に分注する試薬を【6. キットを分割使用する場合の各構成試薬の保存方法】の調製法に従って用もって用意して下さい。
1）Exosome Capture 96 Well Plate（使用分のストリップ）の各ウエルを、反応 / 洗浄液（1×）300 ～ 350 μL で 3 回洗浄する※7。その後、重ねたペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、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。
2）検体希釈液、標準品希釈液（定量測定の場合）、ブランクとして反応 / 洗浄

液（1×）を各ウエルに 100 μL ずつ分注する。
3）プレートシールを貼り※8、マイクロプレート振とう器を用いて約 500rpm で撹拌しながら室温（20 ～ 25℃）で 2 時間反応させる※9。
4）反応終了後、反応液を捨て、各ウエルを反応 / 洗浄液（×1）300 ～ 350 μL で 3 回洗浄する。その後、重ねたペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、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。
5）検出用コントロール抗 CD63 抗体反応液または任意の検出用一次抗体反応液を各ウエルに 100 μL ずつ分注する。
6）プレートシールを貼り※8、マイクロプレート振とう器を用いて約 500rpm で撹拌しながら室温（20 ～ 25℃）で 1 時間反応させる※9。
7）反応終了後、反応液を捨て、各ウエルを反応 / 洗浄液（×1）300 ～ 350 μL で 3 回洗浄する。その後、重ねたペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、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。
8）検出用二次抗体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※8、マイクロプレート振とう器を用いて約 500rpm で撹拌しながら室温（20 ～ 25℃）で 1 時間反応させる※9。
10）反応終了後、反応液を捨て、各ウエルを反応 / 洗浄液（1×）300 ～ 350 μL で 5 回洗浄する。その後、重ねたペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、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。
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 分間撹拌する。
12）プレートシールを貼り※8、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 秒間撹拌後、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）※10 の吸光度を測定する。

※ 7 プレート表面に析出物が見られることがありますが、品質への影響はありません。
※ 8 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して下さい。
※ 9 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りますので、回転式マイクロプレート振とう器を用いて約 500rpm で撹拌しながら反応させることを推奨します。
※10 副波長は 600 ～ 650nm の範囲で使用できます。

【13. 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して下さい。

〈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、検体間で比較して下さい。

〈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）を算出して下さい※11。
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）を算出して下さい。
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して下さい※12。
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ります※13。読み取った濃度に検体希釈率を乗じ測定値とします。

※11 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は、適当倍率に希釈し直して再度測定を実施して下さい。
※12 標準曲線は測定毎に作成して下さい。
※13 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お薦めします。

【14. キット性能参考データ】

■1 各種細胞培養上清から精製した細胞外小胞の定性解析

各種細胞培養上清から精製した細胞外小胞 1ng をウエルに添加し、表面マーカー CD9、CD63、CD81 を認識する検出一次抗体を用いて各表面マーカー量を本キットで定性比較した。また、比較参考データとして各種細胞培養上清から精製した細胞外小胞 150ng を電気泳動し、表面マーカー CD9、CD63、CD81 を認識する検出一次抗体を用いて各表面マーカータンパク質量をウェスタンブロットで定性解析した。

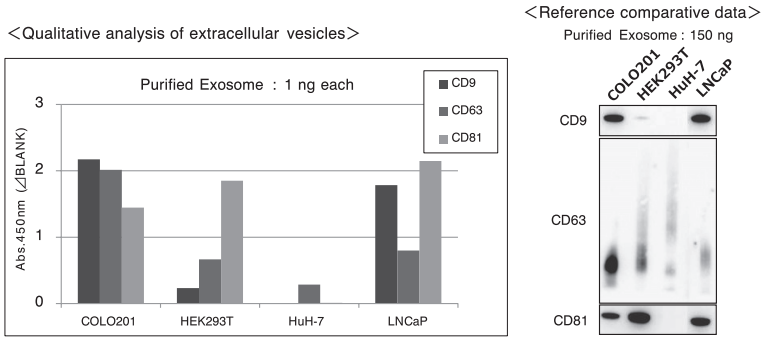


Fig. 2 Qualitative analysis of extracellular vesicles purified from various cell culture supernatants

■2 正常ヒト血清から精製した細胞外小胞の定性解析

正常ヒト血清の個別 6 検体からそれぞれ精製した細胞外小胞 40、20、10 ng をウエルに添加し、表面マーカー CD63 を認識するコントロール検出一次抗体を用いて定性比較した。

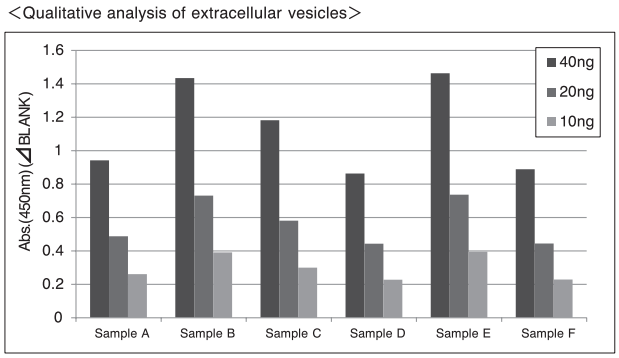
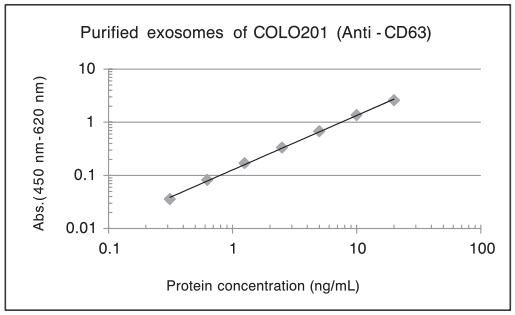


Fig. 3 Qualitative analysis of extracellular vesicles purified from healthy human serum

■3 細胞培養上清から精製した細胞外小胞の標準曲線（Standard curve）参考データ

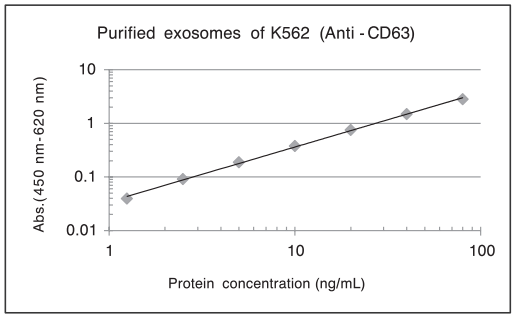
COLO201 細胞培養上清から精製した細胞外小胞の標準曲線例（抗 CD63 抗体検出）

Concentration (ng/mL)	Abs.（450 nm-620 nm）			
	1	2	Mean	⊿Blank
0	0.051	0.0522	0.0516	−
0.3125	0.0859	0.0882	0.0871	0.0355
0.625	0.132	0.1339	0.1330	0.0814
1.25	0.2198	0.2217	0.2208	0.1692
2.5	0.3812	0.382	0.3816	0.3300
5	0.7137	0.7307	0.7222	0.6706
10	1.4068	1.406	1.4064	1.3548
20	2.6552	2.6261	2.6407	2.5891



K562 細胞培養上清から精製した細胞外小胞の標準曲線例（抗 CD63 抗体検出）

Concentration (ng/mL)	Abs.（450 nm-620 nm）			
	1	2	Mean	⊿Blank
0	0.0462	0.0528	0.0495	−
1.25	0.0870	0.0911	0.0891	0.0396
2.5	0.1360	0.1446	0.1403	0.0908
5	0.2355	0.2387	0.2371	0.1876
10	0.4320	0.4205	0.4263	0.3768
20	0.8192	0.7850	0.8021	0.7526
40	1.5618	1.5124	1.5371	1.4876
80	2.9187	2.8005	2.8596	2.8101



■4 細胞培養上清から精製した細胞外小胞の検出感度(Sensitivity)参考データ
各サンプルから精製した細胞外小胞の本アッセイ検出感度（抗 CD63 抗体検出）

	Detection limit (Blank + 3.3SD)	Determination limit (Blank + 10SD)
Purified exosomes of COLO201	0.11ng/mL（11pg）	0.34ng/mL（34pg）
Purified exosomes of K562	0.50ng/mL（50pg）	1.34ng/mL（134pg）

〈比較参考データ〉
COLO201 細胞培養上清から精製した細胞外小胞のウェスタンブロット検出感度（抗 CD63 抗体検出）

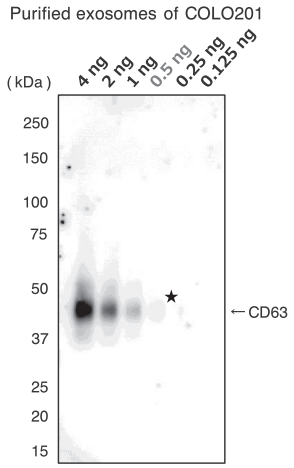


Fig. 4 Result of Western blot analysis
sample : extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells with MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2
★ : Detection limit

■5 細胞培養上清検体の定量解析の正確性（Precision）参考データ
アッセイ内誤差（抗 CD63 抗体検出）
COLO201 細胞および K562 細胞の培養上清から精製した細胞外小胞を標準に用いて標準曲線を作成し、K562 細胞培養上清の 4 段階希釈検体（1：100 ～ 1：800）および COLO201 細胞培養上清の 4 段階希釈検体（1：200 ～ 1：1,600）の濃度測定（n＝6）を行い、測定値の CV（%）を求めた。

Cell culture sup. of COLO201 (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)									
	1	2	3	4	5	6	Mean	SD	CV (%)	
1 : 1600	1.18	1.17	1.16	1.17	1.15	1.14	1.16	0.01	1.3	0.7
1 : 800	2.31	2.32	2.32	2.30	2.31	2.32	2.31	0.01	0.4	
1 : 400	4.82	4.78	4.77	4.78	4.81	4.78	4.79	0.02	0.4	
1 : 200	9.94	9.89	9.76	9.85	9.77	9.96	9.86	0.09	0.9	

Cell culture sup. of K562 (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)									
	1	2	3	4	5	6	Mean	SD	CV (%)	
1 : 800	3.93	3.88	3.88	3.83	3.78	3.86	3.86	0.05	1.3	2.0
1 : 400	7.71	7.82	7.64	7.64	7.48	7.46	7.62	0.13	1.8	
1 : 200	15.47	14.89	15.32	15.32	14.85	14.69	15.09	0.32	2.1	
1 : 100	32.03	31.77	31.21	31.59	30.31	30.03	31.16	0.82	2.6	

アッセイ間誤差（抗 CD63 抗体検出）

COLO201 細胞および K562 細胞の培養上清から精製した細胞外小胞を標準に用いて標準曲線を作成し、K562 細胞培養上清の 4 段階希釈検体（1：100 ～ 1：800）および COLO201 細胞培養上清の 4 段階希釈検体（1：200 ～ 1：1,600）の濃度測定を異なる 3 アッセイ行い、測定値の CV（%）を求めた。

Cell culture sup. of COLO201 (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)						
	1	2	3	Mean	SD	CV (%)	
1 : 1600	1.09	1.07	1.12	1.09	0.02	2.1	1.8
1 : 800	2.13	2.13	2.19	2.15	0.03	1.6	
1 : 400	4.26	4.39	4.42	4.36	0.09	2.0	
1 : 200	8.65	8.80	8.96	8.81	0.16	1.8	

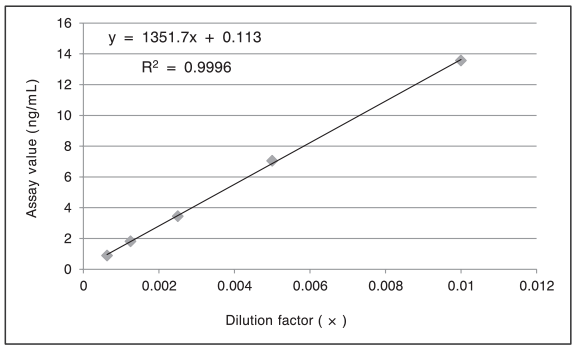
Cell culture sup. of K562 (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)						
	1	2	3	Mean	SD	CV (%)	
1 : 800	3.10	3.30	4.09	3.50	0.52	15.0	8.9
1 : 400	6.53	6.76	7.45	6.91	0.48	6.9	
1 : 200	13.44	14.53	15.27	14.41	0.92	6.4	
1 : 100	27.09	29.19	31.34	29.21	2.12	7.3	

■6 細胞培養上清検体の希釈直線性（Linearity）参考データ

COLO201 細胞および K562 細胞の培養上清から精製した細胞外小胞を標準に用いて標準曲線を作成し COLO201 細胞培養上清の 5 段階希釈検体（1：100 ～ 1：1,600）、K562 細胞培養上清の 5 段階希釈検体（1：50 ～ 1：800）の希釈直線性を評価した。

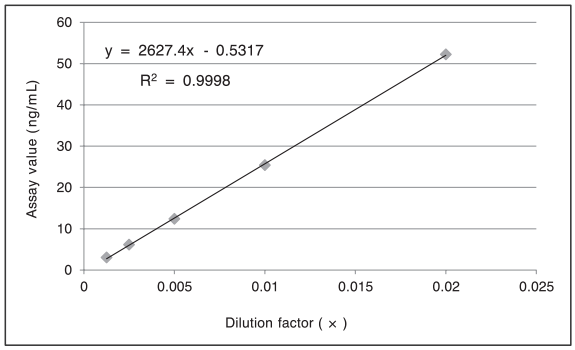
COLO201 細胞培養上清サンプルの希釈直線性（抗 CD63 抗体検出）

Dilution		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Ratio	Factor (×)			
1 : 1600	0.000625	0.89	0.91	98.4
1 : 800	0.00125	1.82	1.72	105.6
1 : 400	0.0025	3.44	3.52	97.8
1 : 200	0.005	7.04	6.78	103.9
1 : 100	0.01	13.6	–	–



K562 細胞培養上清サンプルの希釈直線性（抗 CD63 抗体検出）

Dilution		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Ratio	Factor（×）			
1 : 800	0.00125	3.02	3.07	98.2
1 : 400	0.0025	6.15	6.19	99.3
1 : 200	0.005	12.4	12.7	97.5
1 : 100	0.01	25.4	26.1	97.2
1 : 50	0.02	52.2	–	–



■7 細胞培養上清検体への添加回収（Recovery）参考データ

COLO201 細胞培養上清サンプル 1：400 希釈検体への添加回収

COLO201 細胞培養上清の希釈検体（1：400）に、COLO201 細胞培養上清から精製した 3 濃度（2.5、5、10ng/mL）の細胞外小胞を添加し、検体の濃度測定を行い、回収率を求めた。

Diluted samples of cell culture supernatant of COLO201（1 : 400）

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate (%)	
–	4.23	–	–	
2.5	7.03	2.81	112.2	104
5.0	9.19	4.96	99.2	
10.0	14.3	10.1	100.5	

K562 細胞培養上清サンプル 1：200 希釈検体への添加回収

K562 細胞培養上清の希釈検体（1：200）に、K562 細胞培養上清から精製した 3 濃度（10、20、40ng/mL）の細胞外小胞を添加し、検体の濃度測定を行い、回収率を求めた。

Diluted samples of cell culture supernatant of K562（1 : 200）

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate (%)	
–	14.3	–	–	
10.0	24.6	10.3	103.0	99
20.0	33.8	19.5	97.5	
40.0	53.4	39.1	97.8	

【15. 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て下さい。
- 試薬類を皮膚に付けないで下さい。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充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て下さい。

- 感染の危険性がある検体は充分注意して取り扱って下さい。本キットは動物由来の成分を含んでいます。
- 使用済みの検体、使用した消耗品等は 1% ホルマリン、2% グルター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 時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。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して下さい。
- 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って下さい。
- ELISA 法は測定環境により影響を受けます。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）を厳守して下さい。また、風速（エアコン風も含む）低湿度の環境下での測定は避けて下さい。
- 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して下さい。

【16. 参考文献】

1）W. Nakai, *et al*., *Sci. Rep*., **6**, 33935（2016）.
2）A. Kraft, W81 Award.（2017）.
3）S. Osawa, *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun*., **488**, 232-238（2017）.
4）S. Nagashima, *et al., J. Virol*., **91**（22）, e00822-17（2017）.
5）T. Yoshida, *et al., Curr. Protoc. Cell Biol*., **77**（1）, 3.45.1-3.45.18（2017）.
6）S. Saito, *et al., Sci. Rep*., **8**, 3997（2018）.
7）H. Kobayashi, *et al., Nagoya J. Med. Sci*., **80**（2）, 141-153（2018）.
8）Y. Obata, *et al., JCI Insight*, **3**（8）, e99680（2018）.
9）R.C. Middleton, *et al., J. Extracell. Vesicles*, **7**（1）, 1456888（2018）.
10）H. Kawahara, and R. Hanayama, *Biol. Pharm. Bull*., **41**, 1119-1125（2018）.
11）M. Santiana, *et al., Cell Host & Microbe*, **24**, 208-220（2018）.
12）T. Antes, *et al., J. Nanobiotechnol*., **16**, 61（2018）.
13）H. Kimura, *et al., Clinical Cancer Research*, **25**（6）, 1936-1947（2019）.
14）G. Gorji-Bahri, *et al., Current Gene Therapy*, **18**, 336-350（2018）.
15）H. Xu, *et al*., *Anal. Chem*., **90**（22）, 13451-13458（2018）.
16）H. Kuroda, *et al., Mol Pharm*., **16**, 292-304（2019）.
17）J. Juan, *et al., Stem. Cell Res. Ther*., **10**（1）, 95（2019）.
18）L. Zhi, *et al., Cell Death Discovery*, **5**, 79（2019）.
19）G.K. Patel *et al., Sci Rep*., **9**（1）, 5335（2019）.
20）Y.L. Tai *et al., J. Biomed. Sci*. **26**（1）, 35（2019）.
21）Y. Sugihara *et al., PLoS One*., **14**（5）, e0217394（2019）.

製造発売元
富士フイルム和光純薬株式会社
大阪市中央区道修町三丁目1番2号
Tel：06-6203-3741

2111KA4