

For Genetic Research

PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)**[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.

This is an enzyme immunoassay kit that is utilizable in the qualitative and quantitative analyses of extracellular vesicles in cell culture supernatant and body fluid samples. The microplate in the kit is pre-coated with protein that specifically binds with phosphatidylserine (PS) on the surface of extracellular vesicles. After extracellular vesicles are captured by the plate, biotinylated antibody for the surface marker protein of extracellular vesicles is used as a primary detection. By using HRP-conjugated streptavidin in the kit as a secondary detection, the extracellular vesicles which have any surface marker proteins can be detected with high sensitivity. This kit is capable of using antibodies of a variety of animal species for primary detection by labeling with biotin, though PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti mouse IgG POD) (Code No. 297-79201) is capable of using only mouse monoclonal antibodies. Moreover, as this kit employs HRP-conjugated streptavidin for secondary detection, it exhibits low non-specific binding to blood components. Thus this kit enables sensitive detection of extracellular vesicles in a blood sample, while it is difficult to detect with PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti mouse IgG POD). The kit contains biotin-conjugated anti-human CD63 mouse monoclonal antibody as a control detection antibody to detect human CD63-positive extracellular vesicles.

This kit can easily detect surface marker proteins of extracellular vesicles purified from a sample by MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (Code No. 293-77601) or PS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit (Code No. 290-80301) with 50 to 1,000 times higher sensitivity than Western blot. It can also be used for relative quantitation of extracellular vesicles in cell culture supernatant and body fluid samples using purified extracellular vesicles with an interested surface marker protein as a reference standard.

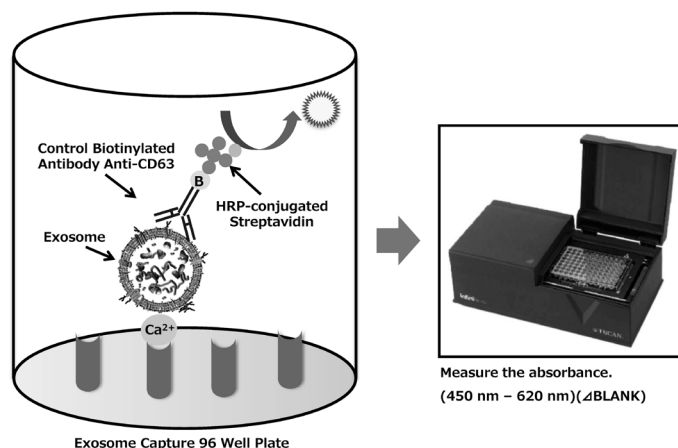


Fig. 1 Measurement principle

[2. Protocol Summary]

Pipette diluted cell culture supernatants, body fluids or purified extracellular vesicles sample with Reaction Buffer in the kit into the wells of Exosome Capture 96 Well Plate (PS-binding protein is pre-coated onto a microplate). Then, incubate the wells for 2 hours with stirring at room temperature. After washing, a biotinylated antibody specific for an interested surface marker protein of extracellular vesicles or Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 contained in the kit is added to the wells as a primary detection reagent. Then, incubate the wells for 1 hour with stirring at room temperature. Following a wash, HRP-conjugated Streptavidin is added to the wells as a secondary detection reagent. Then, incubate the wells for 2 hours with stirring at room temperature. After washing again, react with TMB Solution (coloring reagent) for 30 minutes at room temperature. Add Stop Solution and measure the absorbance at 450 nm (reference wavelength : 620 nm). Compare measurement values of each sample.

For quantitative measurement, prepare a standard curve by plotting absorbance values against concentration in a serial dilution of extracellular vesicles purified using MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (Code No. 293-77601) or PS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit (Code No. 290-80301) as a reference standard. (Confirm previously the extracellular vesicles have an interested surface marker and determine the protein concentration or particle number.) Determine the concentration of the extracellular vesicles in the samples from the standard curve.

[3. Intended Purpose]

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

The kit enables us to perform a highly sensitive qualitative analysis of any surface marker proteins of extracellular vesicles purified from cell culture supernatants or body fluids with MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (Code No. 293-77601) or PS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit (Code No. 290-80301) by using a biotinylated antibody specific for an interested surface marker protein of extracellular vesicles as a primary detection antibody.

(2) A quantitative analysis of extracellular vesicles in cell culture supernatants or body fluids

By preparing a standard curve using purified extracellular vesicles with an interested surface marker protein as a reference standard, permit the relative quantitation of extracellular vesicles which have the surface marker protein in cell culture supernatants or body fluids.

Note : Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 in the kit is specific for human CD63. It does not react with mouse, rat, and bovine CD63. If any surface marker proteins except human CD63 are required to be detected, use appropriate biotinylated antibodies.

[4. Materials 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 Buffer	Ready-to-Use	80 mL × 1 vial
(D) Washing Buffer (10×)	Concentrated Use after dilution	100 mL × 1 vial
(E) Exosome Binding Enhancer (100×)	Concentrated Use after dilution	10 mL × 1 vial
(F) Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 (100×)	Concentrated Use after dilution	120 μL × 1 vial
(G) HRP-conjugated Streptavidin (100×)	Concentrated Use after dilution	240 μL × 1 vial
(H) TMB Solution	Ready-to-Use	12 mL × 1 vial
(I) Stop Solution	Ready-to-Use	12 mL × 1 vial
(J) Instruction Manual	–	1 copy

[5. Storage and Stability]

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

[6. Storage Condition 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°C. The strips are stable until the expiration date.

(C) Reaction Buffer

Just after get the Reaction Buffer out of the refrigerator, dispense the required volume of the solution. The remained solution should be stored at 2-10°C with the cap tightened. It is stable until the expiration date.

(D) Washing Buffer (10×)

Warm to room temperature and dispense the required volume of the solution. The remained solution should be stored at 2-10°C with the cap tightened. It is stable until the expiration date.

(E) Exosome Binding Enhancer (100×)

Warm to room temperature and dispense the required volume of the solution. The remained solution should be stored at 2-10°C with the cap tightened. It is stable until the expiration date.

(F) Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 (100×)

Just after get the Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 (100×) out of the refrigerator, dispense the required volume of the solution. The remained solution should be stored at 2-10°C with the cap tightened. It is stable until the expiration date.

(G) HRP-conjugated Streptavidin (100×)

Just after get the HRP-conjugated Streptavidin (100×) out of the refrigerator, dispense the required volume of the solution. The remained solution should be stored at 2-10°C with the cap tightened. It is stable until the expiration date.

(H) TMB Solution

Just after get the TMB Solution out of the refrigerator, dispense the required volume of the solution. The remained solution should be stored at 2-10°C with the cap tightened. It is stable until the expiration date.

(I) Stop Solution

Just after get the Stop Solution out of the refrigerator, dispense the required volume of the solution. The remained solution should be stored at 2-10°C with the cap tightened. It is stable until the expiration date.

[7. Materials Required, Not Supplied] ~ Use as a check box ~

☐ Purified water (distilled water)

☐ Biotinylated antibody for detection of an interested surface marker on extracellular vesicles (for detection except human CD63)

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-NH₂ (Code No. 347-90891).

☐ Purified extracellular vesicles with an interested surface marker (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).

[8. Other Supplies Required] ~ Use as a check box ~

☐ Test tubes for dilution of samples and antibodies

☐ Glassware for preparation of Reaction/Washing Buffer (Graduated cylinder)

☐ Micropipettes

- ☐ Syringe-type repeating dispenser such as Eppendorf multipipette or ThermoFisher Finnpiptette (If available)
- ☐ Disposable reservoir (As necessary)
- ☐ Paper towels to remove the remained solution in the wells
- ☐ Vortex-type mixer
- ☐ 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
- ☐ 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 Infinite® F50R [450 nm, 620 nm]
- ☐ Software for data analysis
 - Recommended products : Code No. 290-34631 PLATEmanager V5/I PC SET (for infinite)

[9. Standard Preparation (When a quantitative measurement is performed)]

Purify extracellular vesicles from an appropriate sample with MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (Code No. 293-77601) or PS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit (Code No. 290-80301) in accordance with the instruction manual. Measure protein concentration by BCA method etc. or particle numbers by Nanoparticle Tracking Analysis (by using such as NanoSight LM-10)^{*1} of the purified extracellular vesicles. Confirm previously the purified extracellular vesicles have an interested surface marker. Purified extracellular vesicles should be refrigerated^{*2}.

※ 1 Perform each measurement in accordance with an appropriate protocol.

※ 2 Since responsiveness of extracellular vesicles tends to be weakened by freeze-thaw cycles, keep them at 2-10°C.

[10. Reagent Preparation]

Warm the reagents described as “Ready-to-Use” in **[4. Materials Supplied]** to room temperature prior to use. Reagents described as “Use after dilution” shall be prepared as follows. Prepare only as much reagent as needed on the day of the experiment.

10.1 Washing Buffer (1×)

Wash Buffer (10×)^{*3} is diluted 10-fold with purified water (distilled water). Add 1/100 volume of Exosome Binding Enhancer (100×)^{*4} to the diluted solution and mix well^{*5}.

※ 3 Ensure no crystals have formed in the concentrate before use, since ingredients may be deposited by refrigeration storage.

※ 4 Be sure to add Exosome Binding Enhancer (100×) since it is an essential ingredient for extracellular vesicles to bind with a plate.

※ 5 Use Washing Buffer (1×) within 8 hours after Exosome Binding Enhancer (100×) is added since ingredients tend to be deposited.

(e.g.) When solution for 96-well reactions is prepared

Add 100 mL of Washing Buffer (10×) to 900 mL of purified water (distilled water) to prepare 1,000 mL of Washing Buffer (1×). Then add 10 mL of Exosome Binding Enhancer (100×) and mix well.

10.2.1 Biotinylated Antibody Anti-CD63 (1×) (When human CD63 is measured as a surface antigen)

Add 1/100 volume of Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 (100×) to Reaction Buffer contained in the kit and mix well.

(e.g.) When a solution for 96-well reactions is prepared

Add 100 μL of Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 (100×) to 10 mL of Reaction Buffer and mix well.

10.2.2 Biotinylated Antibody (When other surface antigens are measured)

Dilute any biotinylated antibody specific for interested surface protein of extracellular vesicles with Reaction Buffer in the kit to an appropriate concentration.

A rough standard of the biotinylated antibody concentration is 100-500 ng/mL.

(e.g.) When a solution of biotinylated antibody (250 ng/mL) for 96-well reactions is prepared from a biotinylated antibody (1 mg/mL)

Add 5 μ L of biotinylated antibody (1 mg/mL) to 195 μ L of Reaction Buffer and mix well. (25 μ g/mL of 40-fold dilution is prepared). Then add 100 μ L of the 40-fold dilution to 9.9 mL of Reaction Buffer and mix well.

10.3 HRP-conjugated Streptavidin (1 \times)

If Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 contained in the kit is used as a biotinylated antibody, add 1/100 volume of HRP-conjugated Streptavidin (100 \times) to Reaction Buffer in the kit and mix well to prepare HRP-conjugated Streptavidin (1 \times).

If optional biotinylated antibody is used, add 1/50 to 1/200 volume of HRP-conjugated Streptavidin (100 \times) to Reaction Buffer in this kit, and mix well to prepare HRP-conjugated Streptavidin (0.5 \times to 2 \times)^{*6}.

※ 6 If an optional biotinylated antibody is used, it is recommended performing a preliminary examination of dilution factor. Targeting final concentration is 0.5 \times to 2 \times . An appropriate concentration of HRP-conjugated Streptavidin varies depending on the biotin conjugation efficiency of the antibody.

(e.g.) When Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 in this kit is used for 96-wells

Add 100 μ L of HRP-conjugated Streptavidin (100 \times) to 10 mL of Reaction Buffer and mix well.

【11. Standard Curve Preparation for Quantitative Measurement】

Dilute a reference standard of extracellular vesicles prepared in 【9. Standard Preparation (When a quantitative measurement is performed)】 to an appropriate concentration with 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.

(e.g.) To prepare 7 steps of 2-fold serial dilution from 20 ng/mL of the reference standard of extracellular vesicles.

1) Add 5 μ L of standard (20 μ g/mL) to 45 μ L of Reaction Buffer and mix well.

This is 2,000 ng/mL Standard Solution.

2) Use the Standard Solution to prepare the following dilution series.

Standard#	Volume to dilute (μ L)	Reaction Buffer (μ L)	Extracellular vesicles (ng/mL)
1	5 μ L of 2,000 ng/mL Standard Solution	495	20.0
2	250 μ L Standard #1	250	10.0
3	250 μ L Standard #2	250	5.00
4	250 μ L Standard #3	250	2.50
5	250 μ L Standard #4	250	1.25
6	250 μ L Standard #5	250	0.625
7	250 μ L Standard #6	250	0.313
8	—	250	0.00 (Blank)

【12. Sample Dilution】

Dilute sample twice or more with Reaction Buffer using a tube, etc. so that the 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^{*7, 8}. Also, when measuring undiluted cell culture supernatant samples, please add 1/100 volume of Exosome Binding Enhancer (100 \times) to them.

※ 7 Dilute serum, heparin plasma samples twice or more, and EDTA or citric plasma samples 5 times or more to avoid the influence of a chelating agent. As an appropriate dilution factor for a sample differs considerably depending on the concentration of extracellular vesicles in the sample and the amount of surface marker of the object to be detected, it is recommended examining appropriate dilution factor preliminarily by serial dilution of the sample.

※ 8 When large extracellular vesicles such as apoptotic bodies and microvesicles are unnecessary for assay, obtain the "supernatant" centrifuged at $10,000\times g$ for 30 minutes. Then centrifuge the "supernatant" with a centrifugal filter unit (Millipore Ultrafree - MC, GV $0.22\mu m$, sterile, Catalog No. : UFC30GV0S) until required concentrate or filtrate volume is achieved and use it as a sample.

[13. Assay Procedure]

Prepare all reagents as described in [10. Reagent Preparation].

- 1) Wash each well of Exosome Capture 96 Well Plate 3 times with 300 to 350 μL of Washing Buffer ($1\times$)^{※9}. Invert the plate and gently blot it against clean paper towels.
- 2) Add 100 μL of sample dilution, standard dilution (When quantitative analysis is performed), and Reaction Buffer as a blank to each well.
- 3) Cover with a Plate Seal^{※10}. Incubate for 2 hours at room temperature (20-25°C) with shaking at about 500 rpm using a microplate shaker^{※11}.
- 4) Discard the solution and wash 3 times with 300 to 350 μL of Washing Buffer ($1\times$). Invert the plate and gently blot it against clean paper towels.
- 5) Add 100 μL of biotinylated antibody to each well.
- 6) Cover with a new Plate Seal^{※10}. Incubate for 1 hour at room temperature (20-25°C) with shaking at about 500 rpm using a microplate shaker^{※11}.
- 7) Repeat the wash as in step 4).
- 8) Add 100 μL of HRP-conjugated Streptavidin ($1\times$) to each well.
- 9) Cover with a new Plate Seal^{※10}. Incubate for 2 hours at room temperature (20-25°C) with shaking at about 500 rpm using a microplate shaker^{※11}.
- 10) Discard the solution and wash 5 times with 300 to 350 μL of Washing Buffer ($1\times$). Invert the plate and gently blot it against clean paper towels.
- 11) Add 100 μL of TMB Solution warmed to room temperature to each well. Stir for about 1 minute by microplate shaker.
- 12) Cover with a new Plate Seal^{※10}. Incubate for 30 minutes at room temperature (20-25°C).
- 13) Add 100 μL of Stop Solution warmed to room temperature to each well.
- 14) Stir for about 5 seconds by microplate shaker. Measure immediately the absorbance at 450 nm and 620 nm as reference wavelength (600-650 nm)^{※12} using a microplate reader.

※ 9 Deposits may be observed on surface of a plate. It does not affect quality of a product.

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

※11 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. Overnight incubation may be applicable.

※12 The range of 600-650 nm can be used as reference wavelength.

[14. 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^{※13}.
- 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)^{※14}.
- 4) Determine the unknown sample concentration from the Standard Curve^{※15} and multiply the value by the dilution factor.

※ 13 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.

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

※ 15 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.

[15. Precautions]

- 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.
- To ensure accurate results, proper adhesion of Plate Seal during incubation steps is necessary.
- 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. In addition, avoid airstream velocity over 0.4 m/sec, including wind from an air conditioner and humidity less than 30%.
- Avoid cross contamination of samples or reagents by changing tips between sample, standard and reagent additions.

[16. Typical Data]

16.1 Precision

Qualitative Analysis of Cell Culture Supernatant and Serum Samples

16.1.1 Intra-Assay Precision (Precision within an assay) [Detected by Control Biotinylated Antibody Anti-CD63]

A standard curve was prepared using extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells. Determined the concentration of 3-step dilution samples of human serum (1 : 5 to 1 : 20) and 3-step dilution samples of cell culture supernatant of COLO201 cells (1 : 200 to 1 : 800) (n = 5) to assess intra-assay precision.

Human serum (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)							
	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV (%)
1 : 20	1.67	1.57	1.70	1.60	1.66	1.64	0.054	3.28
1 : 10	3.00	2.88	3.16	3.11	3.13	3.06	0.116	3.81
1 : 5	5.54	5.95	6.35	5.48	5.78	5.82	0.349	5.99

COLO201 cell culture supernate (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)							
	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV (%)
1 : 800	1.59	1.57	1.73	1.52	1.63	1.61	0.080	4.98
1 : 400	3.34	3.21	3.51	3.26	3.53	3.37	0.146	4.34
1 : 200	6.37	6.97	6.87	6.81	6.43	6.69	0.270	4.04

16.1.2 Inter-Assay Precision (Precision between assays) [Detected by Control Biotinylated Antibody Anti-CD63]

A standard curve was prepared using extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells. 3-step dilution samples of human serum (1 : 5 to 1 : 20) and 3-step dilution samples of cell culture supernatant of COLO201 cells (1 : 200 to 1 : 800) were tested (n = 2) in four separate assays to assess inter-assay precision.

Human serum (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)							
	1	2	3	4	Mean	SD	CV (%)	
1 : 20	1.31	1.33	1.37	1.27	1.32	0.044	3.33	3.21
1 : 10	2.60	2.55	2.47	2.60	2.56	0.062	2.43	
1 : 5	5.06	5.11	5.07	5.48	5.18	0.200	3.86	

COLO201 cell culture supernate (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)						
	1	2	3	4	Mean	SD	CV (%)
1 : 800	1.70	1.76	1.61	1.61	1.67	0.074	4.45
1 : 400	3.37	3.47	3.16	3.37	3.34	0.131	3.93
1 : 200	6.89	7.57	6.92	6.69	7.02	0.381	5.43

16.2 Linearity

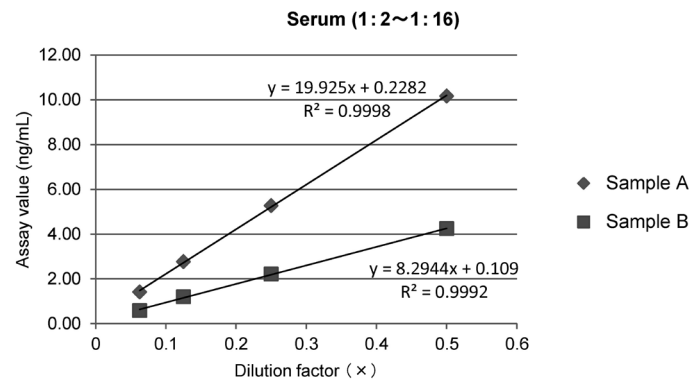
Dilution Linearity of Cell Culture Supernatant and Blood Samples

A standard curve was prepared using extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells. Determined the concentration of 2 types of 4-step dilution samples of human serum (1 : 2 to 1 : 16), 2 types of 4-step dilution samples of human heparin plasma (1 : 2 to 1 : 16), 2 types of 4-step dilution samples of human EDTA plasma (1 : 5 to 1 : 40) and 4-step dilution samples of cell culture supernatant of COLO201 cells (1 : 200 to 1 : 1,600) (n = 2) to assess the linearity of the assay.

16.2.1 Dilution Linearity of Human Serum [Detected by Control Biotinylated Antibody Anti-CD63]

Serum sample A		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Dilution ratio	Dilution factor (×)			
1 : 16	0.0625	1.40	1.38	102
1 : 8	0.125	2.76	2.63	105
1 : 4	0.25	5.27	5.08	104
1 : 2	0.5	10.16	—	—

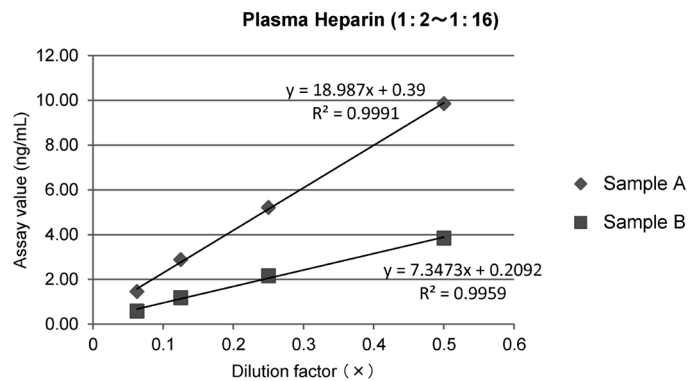
Serum sample B		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Dilution ratio	Dilution factor (×)			
1 : 16	0.0625	0.57	0.60	96
1 : 8	0.125	1.19	1.10	108
1 : 4	0.25	2.21	2.12	104
1 : 2	0.5	4.24	—	—



16.2.2 Dilution Linearity of Human Heparin Plasma [Detected by Control Biotinylated Antibody Anti-CD63]

Plasma (Heparin) sample A		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Dilution ratio	Dilution factor (×)			
1 : 16	0.0625	1.45	1.44	101
1 : 8	0.125	2.87	2.60	111
1 : 4	0.25	5.20	4.92	106
1 : 2	0.5	9.84	—	—

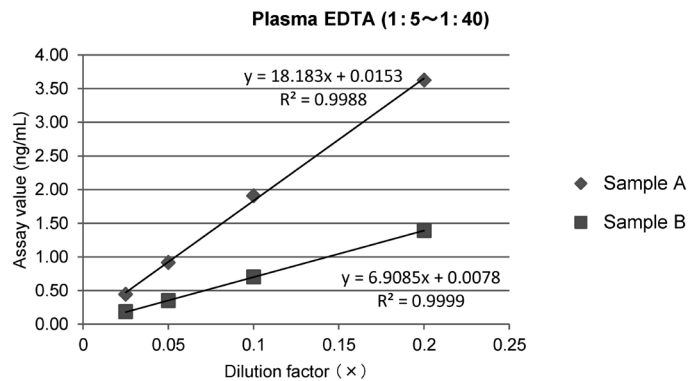
Plasma (Heparin) sample B		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Dilution ratio	Dilution factor (×)			
1 : 16	0.0625	0.57	0.59	97
1 : 8	0.125	1.17	1.08	109
1 : 4	0.25	2.15	1.92	112
1 : 2	0.5	3.83	—	—



16.2.3 Dilution Linearity of Human EDTA Plasma [Detected by Control Biotinylated Antibody Anti-CD63]

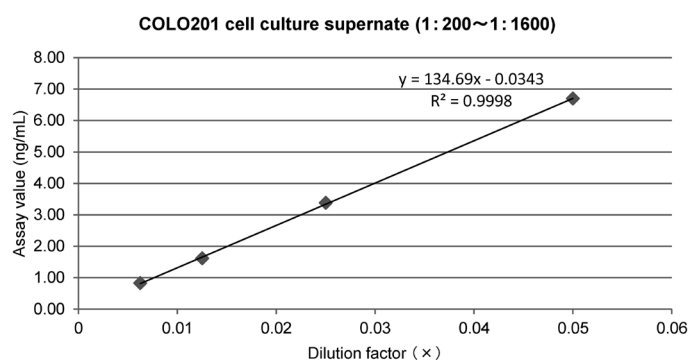
Plasma (EDTA) sample A		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Dilution ratio	Dilution factor (×)			
1 : 40	0.025	0.44	0.46	96
1 : 20	0.05	0.91	0.95	96
1 : 10	0.1	1.91	1.81	105
1 : 5	0.2	3.62	—	—

Plasma (EDTA) sample B		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Dilution ratio	Dilution factor (×)			
1 : 40	0.025	0.18	0.17	106
1 : 20	0.05	0.35	0.35	99
1 : 10	0.1	0.70	0.69	101
1 : 5	0.2	1.39	—	—



16.2.4 Dilution Linearity of Cell Culture Supernatant of COLO201 cells [Detected by Control Biotinylated Antibody Anti-CD63]

COLO201 cell culture supernate		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Dilution ratio	Dilution factor (×)			
1 : 1600	0.00625	0.82	0.81	102
1 : 800	0.0125	1.61	1.69	96
1 : 400	0.025	3.37	3.35	101
1 : 200	0.05	6.69	—	—



16.3 Recovery

Spike and Recovery Assay with Cell Culture Supernatant and Blood Samples

16.3.1 Spike and Recovery on Diluted Human Serum Samples (1 : 5) [Detected by Control Biotinylated Antibody Anti-CD63]

Three concentrations of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells spiked to diluted human serum (1 : 5) and the concentrations of extracellular vesicles were measured to assess the recovery rate.

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	4.51	—	—	101
1.29	5.81	1.29	101	
2.34	6.85	2.33	100	
4.60	9.27	4.75	103	

16.3.2 Spike and Recovery on Diluted Human Serum Samples (1 : 2 to 1 : 8) [Detected by Biotinylated Antibody Anti-EpCAM]

Three concentrations of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells spiked to diluted human serum (1 : 2 to 1 : 8) and the concentrations of extracellular vesicles were measured to assess the recovery rate.

〈Human Serum (1 : 8)〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.01	—	—	99
1.09	1.15	1.14	105	
2.25	2.19	2.18	97	
4.59	4.43	4.42	96	

〈Human Serum (1 : 4)〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.18	—	—	—
1.09	1.27	1.10	101	95
2.25	2.26	2.08	93	
4.59	4.40	4.22	92	

〈Human Serum (1 : 2)〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.38	—	—	—
1.09	1.42	1.04	95	91
2.25	2.38	2.00	89	
4.59	4.43	4.05	88	

16.3.3 Spike and Recovery on Diluted Human Heparin Plasma Samples (1 : 5) [Detected by Control Biotinylated Antibody Anti-CD63]

Three concentrations of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells spiked to diluted human heparin plasma (1 : 5) and the concentrations of extracellular vesicles were measured to assess the recovery rate.

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	2.54	—	—	—
1.29	3.62	1.08	84	89
2.34	4.61	2.07	88	
4.60	6.85	4.31	94	

16.3.4 Spike and Recovery on Diluted Human Heparin Plasma Samples (1 : 2 to 1 : 8) [Detected by Biotinylated Antibody Anti-EpCAM]

Three concentrations of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells spiked to diluted human heparin plasma (1 : 2 to 1 : 8) and the concentrations of extracellular vesicles were measured to assess the recovery rate.

〈Human Heparin Plasma (1 : 8)〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.25	—	—	—
1.09	1.33	1.08	99	96
2.25	2.40	2.16	96	
4.59	4.54	4.29	93	

〈Human Heparin Plasma (1 : 4)〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.34	—	—	—
1.09	1.42	1.08	100	94
2.25	2.42	2.09	93	
4.59	4.48	4.15	90	

〈Human Heparin Plasma (1 : 2)〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.43	—	—	—
1.09	1.52	1.09	100	96
2.25	2.57	2.13	95	
4.59	4.72	4.29	93	

16.3.5 Spike and Recovery on Diluted Human EDTA Plasma Samples (1 : 5) [Detected by Control Biotinylated Antibody Anti-CD63]

Three concentrations of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells spiked to diluted human EDTA plasma (1 : 5) and the concentrations of extracellular vesicles were measured to assess the recovery rate.

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	2.59	—	—	—
1.29	3.94	1.36	106	99
2.34	4.77	2.18	93	
4.60	7.13	4.55	99	

16.3.6 Spike and Recovery on Diluted Human EDTA Plasma Samples (1 : 2 to 1 : 8) [Detected by Biotinylated Antibody Anti-EpCAM]

Three concentrations of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells spiked to diluted human EDTA plasma (1 : 2 to 1 : 8) and the concentrations of extracellular vesicles were measured to assess the recovery rate.

〈Human EDTA Plasma (1 : 8)〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.33	—	—	—
1.09	1.56	1.23	113	107
2.25	2.65	2.32	103	
4.59	5.13	4.79	104	

〈Human EDTA Plasma (1 : 4)〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.92	—	—	—
1.09	2.09	1.17	108	103
2.25	3.18	2.26	100	
4.59	5.60	4.68	102	

〈Human EDTA Plasma (1 : 2)〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	1.86	—	—	—
1.09	2.95	1.08	100	94
2.25	3.90	2.04	91	
4.59	6.01	4.15	90	

16.3.7 Spike and Recovery on Diluted Cell Culture Supernatant of COLO201 (1 : 800)
[Detected by Control Biotinylated Antibody Anti-CD63]

Three concentrations of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells spiked to diluted cell culture supernatant of COLO201 (1 : 800) and the concentrations of extracellular vesicles were measured to assess the recovery rate.

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	1.77	—	—	—
1.24	3.24	1.47	119	102
2.66	4.18	2.41	91	
5.24	6.91	5.14	98	

16.3.8 Spike and Recovery on Diluted Cell Culture Supernatant of COLO201 (1 : 800)
[Detected by Biotinylated Antibody Anti-EpCAM]

Three concentrations of extracellular vesicles purified from cell culture supernatant of COLO201 cells spiked to diluted cell culture supernatant of COLO201 (1 : 800) and the concentrations of extracellular vesicles were measured to assess the recovery rate.

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	1.93	—	—	—
1.20	3.3	1.37	114	109
2.31	4.48	2.55	110	
4.60	6.67	4.74	103	

[17. Related Products]

Code No.	Description	Size
299-77603	MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS	2 purifications
293-77601		10 purifications
297-79201	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD)	96 reactions
297-79701	PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit	300 reactions
290-80301	PS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit	1 Kit (0.5 mL Slurry)
016-27061	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13)	20 μ L
012-27063		100 μ L
018-27641	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Fluorescein Conjugated	25 tests
014-27643		100 tests
013-27711	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Biotin Conjugated	20 μ L
019-27713		100 μ L
011-27751	Anti CD63, Monoclonal Antibody (3-13), Red Fluorochrome (635) Conjugated	25 tests
017-27753		100 tests
018-27761	Anti CD9, Monoclonal Antibody (1K)	20 μ L
014-27763		100 μ L
015-27771	Anti CD81, Monoclonal Antibody (17B1)	20 μ L
011-27773		100 μ L
058-09261	EV-Save™ Extracellular Vesicle Blocking Reagent	1 mL

[18. 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 : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-3111-100
<http://www.wako-chemicals.de>

遺伝子研究用

PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)

【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中の細胞外小胞の定性解析および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) と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ビオチン標識抗体を一次検出に、キット付属の HRP 標識ストレプトアビジンを二次検出に用いることで、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。PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti mouse IgG POD) (Code No. 297-79201) は一次検出にマウスモノクローナル抗体しか用いることができませんでしたが、本キットは様々な動物種の抗体をビオチン標識することで一次検出に用いることができます。また、本キットは二次検出に HRP 標識ストレプトアビジンを採用しているため、血液成分への非特異結合が低く、PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti mouse IgG POD) では困難であった血液サンプル中の細胞外小胞を高感度に検出することができます。なお、キットにはコントロール検出抗体としてビオチン標識抗ヒト 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 (Code No. 293-77601) または PS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit (Code No. 290-80301) 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、任意の表面マーカータンパク質を有する精製細胞外小胞を標準品に用いることで、細胞培養上清および体液検体中の細胞外小胞を相対定量することができます。

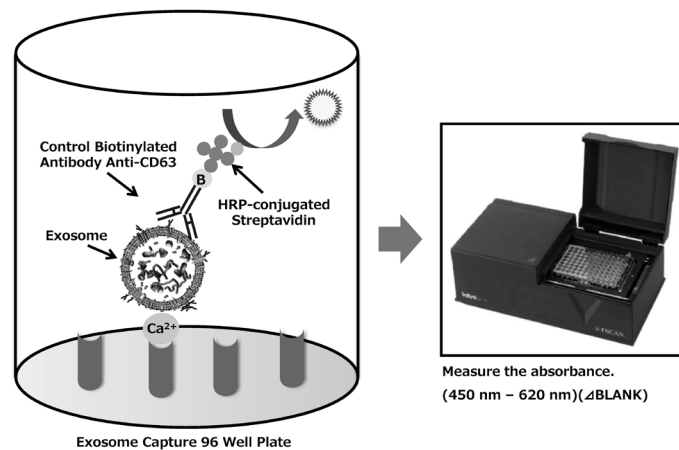


Fig. 1 Measurement principle

【2. 測定方法の概要】

キット添付の Reaction Buffer で希釈した細胞培養上清、体液または精製細胞外小胞サンプルを、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、ウエル中で攪拌しながら室温で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ビオチン標識抗体、またはキット付属の Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 反応液を加え、攪拌しながら室温で1時間インキュベートします。洗浄後、検出用二次反応液として HRP-conjugated Streptavidin を加え、攪拌しながら室温で2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使用する場合は、MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (Code No. 293-77601) または PS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit (Code No. 290-80301) を用いて精製した細胞外小胞 (事前に任意の表面マーカーを有することの確認、および、タンパク質濃度または粒子数を測定して下さい。) を標準品に用いて、その標準品希釈系列濃度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ビオチン標識抗体を一次検出に用いることで、細胞培養上清や体液検体中の細胞外小胞や、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) 細胞培養上清および体液検体中の細胞外小胞の定量解析
任意の表面マーカータンパク質を有する精製細胞外小胞を標準品に用い、標準曲線を作成することで、細胞培養上清および体液検体中の任意の表面マーカータンパク質を有する細胞外小胞を相対定量することができます。

※キットのコントロールビオチン標識抗体である Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 はヒト CD63 を検出しますが、マウス、ラット、ウシ CD63 は検出しません。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、適切なビオチン標識抗体をご使用下さい。

【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 Buffer	そのまま使用	80mL × 1 本
(D) Washing Buffer (10×)	調製後使用	100mL × 1 本
(E) Exosome Binding Enhancer (100×)	調製後使用	10mL × 1 本
(F) Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 (100×)	調製後使用	120 μL × 1 本
(G) HRP-conjugated Streptavidin (100×)	調製後使用	240 μL × 1 本
(H) TMB Solution	そのまま使用	12mL × 1 本
(I) Stop Solution	そのまま使用	12mL × 1 本
(J) 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内で安定です (有効期限はラベルに記載)。有効期限を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バックに戻し、そのまま2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。

(C) Reaction Buffer

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、残りの溶液は容器の蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。

(D) Washing Buffer (10×)

室温に戻して必要量の溶液を分注した後、残りの溶液は容器の蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。

(E) Exosome Binding Enhancer (100×)

室温に戻して必要量の溶液を分注した後、残りの溶液は容器の蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。

(F) Control Biotinylated 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、残りの溶液は容器の蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。

(G) HRP-conjugated Streptavidin (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、残りの溶液は容器の蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。

(H) 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、残りの溶液は容器の蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。

(I) 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、残りの溶液は容器の蓋をしっかりと閉め、2～10℃で保存して下さい。有効期限内は安定です。

【7. キット以外に必要な試薬】 ～チェックリスト～

- ☐ 精製水（蒸留水）
- ☐ 任意の細胞外小胞表面マーカー検出用ビオチン標識抗体（ヒト CD63 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ます。
- ☐ 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し、準備して下さい。

【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 ウェ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 ウェ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]
- ☐ データ計算用ソフトウェア
推奨品：Code No. 290-34631 PLATEmanager® V5/I PC SET (for infinite)

【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 (Code No. 293-77601) または PS Capture™ Exosome Isolation Resin Kit (Code No. 290-80301) を用いて、適切な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}。また、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てから、標準品としてご使用下さい。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ルに従って実施して下さい。

※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勧めします。

【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からご使用下さい。各試薬は測定に必要な分だけ用時調製して下さい。

洗浄液（1×）の調製

Washing Buffer（10×）^{*3}を精製水（蒸留水）で10倍希釈した後、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 Washing Buffer（10×）は冷蔵保管で成分が析出する可能性があるため、室温に戻した後、析出物がないことを確認してからご使用下さい。

※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時間以内に使用して下さい。

（例）96 ウェル反応分を調製する場合

100mL の 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、よく混合する。

ビオチン標識抗 CD63 抗体反応液（1×）の調製（表面抗原としてヒト CD63 を測定する場合）

キット付属の Reaction Buffer に対して 1/100 量の Control Biotinylated Antibody Anti-CD63（100×）を添加して、よく混合して下さい。

（例）96 ウェル反応分を調製する場合

10mL の Reaction Buffer に 100 μ L の Control Biotinylated Antibody Anti-CD63（100×）を添加し、よく混合する。

ビオチン標識抗体反応液の調製（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ビオチン標識抗体を、キット付属の Reaction Buffer で適切な濃度に希釈して下さい。ビオチン標識抗体反応液の抗体濃度の目安は 100 ～ 500ng/mL です。

（例）ビオチン標識抗体（1mg/mL）からビオチン標識抗体反応液（250ng/mL）を 96 ウェル反応分調製する場合

195 μ L の Reaction Buffer に 5 μ L のビオチン標識抗体（1mg/mL）を添加混合し、40 倍希釈液（25 μ g/mL）を作製する。その後 9.9mL の Reaction Buffer に 100 μ L の 40 倍希釈液を添加してよく混合する。

HRP 標識ストレプトアビジン反応液（1×）の調製

ビオチン標識抗体にキット付属の Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 を使用する場合は、キット付属の Reaction Buffer に対して 1/100 量の HRP-conjugated Streptavidin（100×）を添加してよく混合し、HRP 標識ストレプトアビジン反応液（1×）を調製して下さい。

ビオチン標識抗体に上記以外のビオチン標識抗体を使用する場合は、キット付属の Reaction Buffer に対して 1/50 ～ 1/200 量の HRP-conjugated Streptavidin（100×）を添加してよく混合し、HRP 標識ストレプトアビジン反応液（0.5×～2×）を調製して下さい^{*6}。

※ 6 キット付属の Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 以外のビオチン標識抗体を使用する場合は、抗体のビオチン標識効率などにより適切な HRP 標識ストレプトアビジン濃度が異なるため、終濃度 $0.5 \times \sim 2 \times$ を目安に希釈濃度の予備検討を行ってから使用濃度を決定することを推奨します。

(例) ビオチン標識抗体にキット付属の Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 を用い、96 ウエル全てに使用する場合
10mL の Reaction Buffer に $100 \mu\text{L}$ の HRP-conjugated Streptavidin ($100 \times$) を添加してよく混合する。

【11. 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 $0.1 \sim 3.0$ の範囲に入る希釈系列となるように、キット付属の Reaction Buffer 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 $20 \mu\text{g/mL}$) 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 ($20 \mu\text{g/mL}$) $5 \mu\text{L}$ と Reaction Buffer $45 \mu\text{L}$ を混合し、細胞外小胞標準品 10 倍希釈液 ($2,000\text{ng/mL}$) を調製する。
- 2) 下記の表の割合で Reaction Buffer 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 #	標準溶液の容量 (μL)	Reaction Buffer (μL)	標準溶液濃度 (ng/mL)
1	10 倍希釈液 ($2,000\text{ng/mL}$) : $5 \mu\text{L}$	495	20.0
2	標準溶液 #1 : $250 \mu\text{L}$	250	10.0
3	標準溶液 #2 : $250 \mu\text{L}$	250	5.00
4	標準溶液 #3 : $250 \mu\text{L}$	250	2.50
5	標準溶液 #4 : $250 \mu\text{L}$	250	1.25
6	標準溶液 #5 : $250 \mu\text{L}$	250	0.625
7	標準溶液 #6 : $250 \mu\text{L}$	250	0.313
8	—	250	0.00 (Blank)

【12. 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 $0.2 \sim 2.5$ 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 Reaction Buffer で 2 倍以上に希釈して下さい^{*7,8}。また、細胞培養上清を希釈せずに測定する場合は、Exosome Binding Enhancer ($100 \times$) を $1 \times$ となるように添加して下さい。

※ 7 血清、ヘパリン血漿サンプルは 2 倍以上に、EDTA 血漿やクエン酸血漿サンプルはキレート剤の影響を避けるために 5 倍以上に希釈して下さい。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りますので、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します。

※ 8 検体からアポトーシス小胞やマイクロベジクルなどの Large EVs を除いたサンプルを測定したい場合、検体を $10,000 \times g$ で 30 分間遠心分離した「上清」を取得後、遠心式フィルターユニット (Millipore 社 Ultrafree[®]-MC, GV $0.22 \mu\text{m}$ 滅菌済、メーカーコード: UFC30GV0S) を通した濾過液をサンプルとしてご使用下さい。

【13. 操作法】
下記の各洗浄ステップを始める前に、以下分注する試薬を【10. 試薬の調製】の調製法に従って用意して下さい。

- 1) Exosome Capture 96 Well Plate の各ウエルを、洗浄液 ($1 \times$) $300 \sim 350 \mu\text{L}$ で 3 回洗浄する^{*9}。その後、重ねたペーパータオルなどの上でプレート逆にし、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。
- 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 Reaction Buffer を各ウエルに $100 \mu\text{L}$ ずつ分注する。
- 3) プレートシールを貼り^{*10}、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 ($20 \sim 25^\circ\text{C}$) で 2 時間反応させる^{*11}。
- 4) 反応終了後、反応液を捨て、各ウエルを洗浄液 ($1 \times$) $300 \sim 350 \mu\text{L}$ 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) ビオチン標識抗体反応液を各ウエルに 100 μ L ずつ分注する。
 - 6) プレートシールを貼り^{*10}、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^{*11}。
 - 7) 反応終了後、反応液を捨て、各ウエルを洗浄液 (1×) 300 ~ 350 μ L 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) HRP 標識ストレプトアビジン反応液 (1×) を各ウエルに 100 μ L ずつ分注する。
 - 9) プレートシールを貼り^{*10}、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^{*11}。
 - 10) 反応終了後、反応液を捨て、各ウエルを洗浄液 (1×) 300 ~ 350 μ L 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 μ L 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^{*10}、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 μ L 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 450nm の吸光度と副波長 620nm (600 ~ 650nm)^{*12} の吸光度を測定する。

※ 9 プレートの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。

※ 10 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ご使用下さい。

※ 11 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。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します。また、O/N で反応させることも可能です。

※ 12 副波長は 600 ~ 650nm の範囲で使用できます。

【14. 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ご使用下さい。

＜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^{*13}。
- 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^{*14}。
- 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^{*15}。読み取った濃度に検体希釈率を乗じ測定値とします。

※ 13 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。

※ 14 標準曲線は測定毎に作成して下さい。

※ 15 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勧めします。

【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十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要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みます。
- ・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た後、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、反応場所の温度：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、エアコンなどによる風のある環境下での測定（風速 0.4m/ 秒以上）や、低湿度環境下での測定（湿度 30% 未満）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. キット性能参考データ】

16.1 血清検体および細胞培養上清検体の定量解析の正確性（Precision）参考データ

16.1.1 アッセイ内誤差（Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 使用）

COLO201 細胞培養上清から精製した細胞外小胞を標準品に用いて標準曲線を作成し、ヒトプール血清の 3 段階希釈検体（1：5～1：20）および COLO201 細胞培養上清の 3 段階希釈検体（1：200～1：800）の濃度測定（n=5）を行い、測定値の CV（%）を求めた。

Human serum (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)							
	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV (%)
1：20	1.67	1.57	1.70	1.60	1.66	1.64	0.054	3.28
1：10	3.00	2.88	3.16	3.11	3.13	3.06	0.116	3.81
1：5	5.54	5.95	6.35	5.48	5.78	5.82	0.349	5.99

COLO201 cell culture supernate (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)							
	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV (%)
1：800	1.59	1.57	1.73	1.52	1.63	1.61	0.080	4.98
1：400	3.34	3.21	3.51	3.26	3.53	3.37	0.146	4.34
1：200	6.37	6.97	6.87	6.81	6.43	6.69	0.270	4.04

16.1.2 アッセイ間誤差（Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 使用）

COLO201 細胞培養上清から精製した細胞外小胞を標準品に用いて標準曲線を作成し、ヒトプール血清の 3 段階希釈検体（1：5～1：20）および COLO201 細胞培養上清の 3 段階希釈検体（1：200～1：800）の濃度測定（n=2）を異なる 4 アッセイで行い、測定値の CV（%）を求めた。

Human serum (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)							
	1	2	3	4	Mean	SD	CV (%)	
1：20	1.31	1.33	1.37	1.27	1.32	0.044	3.33	3.21
1：10	2.60	2.55	2.47	2.60	2.56	0.062	2.43	
1：5	5.06	5.11	5.07	5.48	5.18	0.200	3.86	

COLO201 cell culture supernate (Dilution ratio)	Assay value (ng/mL)							
	1	2	3	4	Mean	SD	CV (%)	
1：800	1.70	1.76	1.61	1.61	1.67	0.074	4.45	4.60
1：400	3.37	3.47	3.16	3.37	3.34	0.131	3.93	
1：200	6.89	7.57	6.92	6.69	7.02	0.381	5.43	

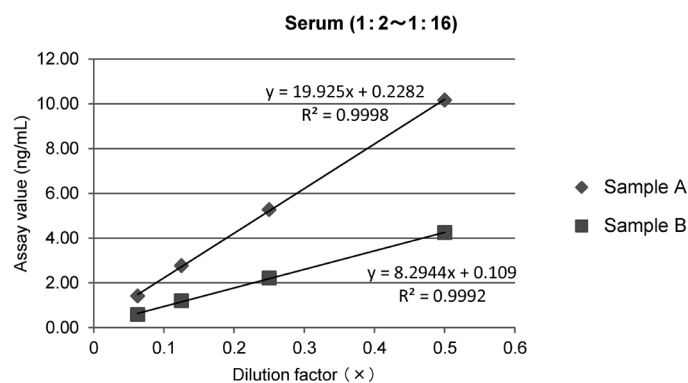
16.2 血液検体および細胞培養上清検体の希釈直線性（Linearity）参考データ

COLO201 細胞培養上清から精製した細胞外小胞を標準品に用いて標準曲線を作成し、ヒト血清 2 検体の 4 段階希釈検体（1：2～1：16）、ヒトヘパリン血漿 2 検体の 4 段階希釈検体（1：2～1：16）、ヒト EDTA 血漿 2 検体の 4 段階希釈検体（1：5～1：40）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=2）を行い、各検体の希釈直線性を評価した。

16.2.1 ヒト血清サンプルの希釈直線性 (Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 使用)

Serum sample A		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Dilution ratio	Dilution factor (×)			
1 : 16	0.0625	1.40	1.38	102
1 : 8	0.125	2.76	2.63	105
1 : 4	0.25	5.27	5.08	104
1 : 2	0.5	10.16	—	—

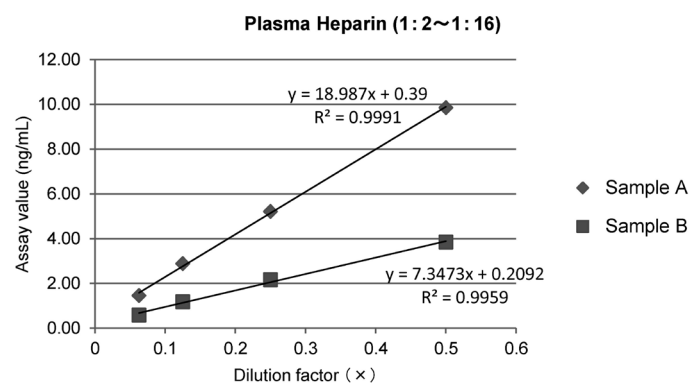
Serum sample B		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Dilution ratio	Dilution factor (×)			
1 : 16	0.0625	0.57	0.60	96
1 : 8	0.125	1.19	1.10	108
1 : 4	0.25	2.21	2.12	104
1 : 2	0.5	4.24	—	—



16.2.2 ヒトヘパリン血漿サンプルの希釈直線性 (Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 使用)

Plasma (Heparin) sample A		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Dilution ratio	Dilution factor (×)			
1 : 16	0.0625	1.45	1.44	101
1 : 8	0.125	2.87	2.60	111
1 : 4	0.25	5.20	4.92	106
1 : 2	0.5	9.84	—	—

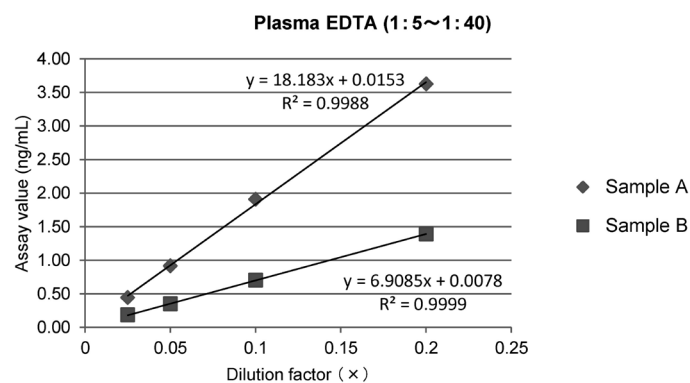
Plasma (Heparin) sample B		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Dilution ratio	Dilution factor (×)			
1 : 16	0.0625	0.57	0.59	97
1 : 8	0.125	1.17	1.08	109
1 : 4	0.25	2.15	1.92	112
1 : 2	0.5	3.83	—	—



16.2.3 ヒト EDTA 血漿サンプルの希釈直線性 (Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 使用)

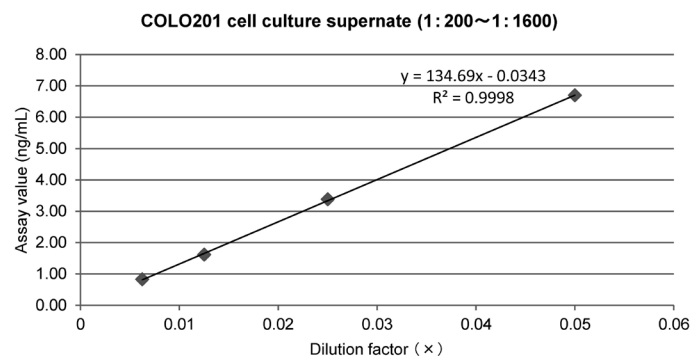
Plasma (EDTA) sample A		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Dilution ratio	Dilution factor (×)			
1 : 40	0.025	0.44	0.46	96
1 : 20	0.05	0.91	0.95	96
1 : 10	0.1	1.91	1.81	105
1 : 5	0.2	3.62	—	—

Plasma (EDTA) sample B		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Dilution ratio	Dilution factor (×)			
1 : 40	0.025	0.18	0.17	106
1 : 20	0.05	0.35	0.35	99
1 : 10	0.1	0.70	0.69	101
1 : 5	0.2	1.39	—	—



16.2.4 COLO201 細胞培養上清サンプルの希釈直線性 (Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 使用)

COLO201 cell culture supernate		Assay value (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	% of expected
Dilution ratio	Dilution factor (×)			
1 : 1600	0.00625	0.82	0.81	102
1 : 800	0.0125	1.61	1.69	96
1 : 400	0.025	3.37	3.35	101
1 : 200	0.05	6.69	—	—



16.3 血液検体および細胞培養上清検体への添加回収 (Recovery) 参考データ

16.3.1 ヒト血清 (1:5 希釈) 検体への添加回収 (Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 使用)

ヒトプール血清の希釈検体 (1:5) に、COLO201 細胞培養上清から精製した 3 濃度の細胞外小胞を添加し、CD63 測定における回収率を求めた。

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	4.51	—	—	—
1.29	5.81	1.29	101	101
2.34	6.85	2.33	100	
4.60	9.27	4.75	103	

16.3.2 ヒト血清 (1:2 ~ 1:8 希釈) 検体への添加回収 (ビオチン標識抗 EpCAM 抗体使用)
ヒトプール血清の希釈検体 (1:2 ~ 1:8) に、COLO201 細胞培養上清から精製した 3 濃度の細胞外小胞を添加し、EpCAM 測定における回収率を求めた。

〈ヒト血清 (1:8 希釈)〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.01	—	—	—
1.09	1.15	1.14	105	99
2.25	2.19	2.18	97	
4.59	4.43	4.42	96	

〈ヒト血清 (1:4 希釈)〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.18	—	—	—
1.09	1.27	1.10	101	95
2.25	2.26	2.08	93	
4.59	4.40	4.22	92	

〈ヒト血清 (1:2 希釈)〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.38	—	—	—
1.09	1.42	1.04	95	91
2.25	2.38	2.00	89	
4.59	4.43	4.05	88	

16.3.3 ヒトヘパリン血漿（1：5 希釈）検体への添加回収（Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 使用）

ヒトプールヘパリン血漿の希釈検体（1：5）に、COLO201 細胞培養上清から精製した 3 濃度の細胞外小胞を添加し、CD63 測定における回収率を求めた。

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	2.54	—	—	—
1.29	3.62	1.08	84	89
2.34	4.61	2.07	88	
4.60	6.85	4.31	94	

16.3.4 ヒトヘパリン血漿（1：2 ～ 1：8 希釈）検体への添加回収（ビオチン標識抗 EpCAM 抗体使用）

ヒトプールヘパリン血漿の希釈検体（1：2 ～ 1：8）に、COLO201 細胞培養上清から精製した 3 濃度の細胞外小胞を添加し、EpCAM 測定における回収率を求めた。

〈ヒトヘパリン血漿（1：8 希釈）〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.25	—	—	—
1.09	1.33	1.08	99	96
2.25	2.40	2.16	96	
4.59	4.54	4.29	93	

〈ヒトヘパリン血漿（1：4 希釈）〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.34	—	—	—
1.09	1.42	1.08	100	94
2.25	2.42	2.09	93	
4.59	4.48	4.15	90	

〈ヒトヘパリン血漿（1：2 希釈）〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.43	—	—	—
1.09	1.52	1.09	100	96
2.25	2.57	2.13	95	
4.59	4.72	4.29	93	

16.3.5 ヒト EDTA 血漿（1：5 希釈）検体への添加回収（Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 使用）

ヒトプール EDTA 血漿の希釈検体（1：5）に、COLO201 細胞培養上清から精製した 3 濃度の細胞外小胞を添加し、CD63 測定における回収率を求めた。

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	2.59	—	—	—
1.29	3.94	1.36	106	99
2.34	4.77	2.18	93	
4.60	7.13	4.55	99	

16.3.6 ヒト EDTA 血漿（1：2～1：8 希釈）検体への添加回収（ビオチン標識抗 EpCAM 抗体使用）

ヒトプール EDTA 血漿の希釈検体（1：2～1：8）に、COLO201 細胞培養上清から精製した 3 濃度の細胞外小胞を添加し、EpCAM 測定における回収率を求めた。

〈ヒト EDTA 血漿（1：8 希釈）〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.33	—	—	—
1.09	1.56	1.23	113	107
2.25	2.65	2.32	103	
4.59	5.13	4.79	104	

〈ヒト EDTA 血漿（1：4 希釈）〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	0.92	—	—	—
1.09	2.09	1.17	108	103
2.25	3.18	2.26	100	
4.59	5.60	4.68	102	

〈ヒト EDTA 血漿（1：2 希釈）〉

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	1.86	—	—	—
1.09	2.95	1.08	100	94
2.25	3.90	2.04	91	
4.59	6.01	4.15	90	

16.3.7 COLO201 細胞培養上清（1：800 希釈）検体への添加回収（Control Biotinylated Antibody Anti-CD63 使用）

COLO201 細胞培養上清の希釈検体（1：800）に、COLO201 細胞培養上清から精製した 3 濃度の細胞外小胞を添加し、CD63 測定における回収率を求めた。

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	1.77	—	—	—
1.24	3.24	1.47	119	102
2.66	4.18	2.41	91	
5.24	6.91	5.14	98	

16.3.8 COLO201 細胞培養上清（1：800 希釈）検体への添加回収（ビオチン標識抗 EpCAM 抗体使用）

COLO201 細胞培養上清の希釈検体（1：800）に、COLO201 細胞培養上清から精製した 3 濃度の細胞外小胞を添加し、EpCAM 測定における回収率を求めた。

Spiked value (ng/mL)	Assay value (ng/mL)	Recovery value (ng/mL)	Recovery rate	
			(%)	Mean (%)
0.00	1.93	—	—	—
1.20	3.3	1.37	114	109
2.31	4.48	2.55	110	
4.60	6.67	4.74	103	

【17. 関連製品】

コード No.	品 名	容 量
299-77603	MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS	2 回用
293-77601		10 回用
297-79201	PS Capture™ エクソソーム ELISA キット (抗マウス IgG POD)	96 回用
297-79701	PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット	300 回用
290-80301	PS Capture™ エクソソームアイソレーションレジンキット	1Kit (0.5mL Slurry)
016-27061	抗 CD63, モノクローナル抗体 (3-13)	20 μ L
012-27063		100 μ L
018-27641	抗 CD63, モノクローナル抗体 (3-13), フルオレセイン結合	25 回用
014-27643		100 回用
013-27711	抗 CD63, モノクローナル抗体 (3-13), ビオチン結合	20 μ L
019-27713		100 μ L
011-27751	抗 CD63, モノクローナル抗体 (3-13), 赤色蛍光色素 (635) 結合	25 回用
017-27753		100 回用
018-27761	抗 CD9, モノクローナル抗体 (1K)	20 μ L
014-27763		100 μ L
015-27771	抗 CD81, モノクローナル (17B1)	20 μ L
011-27773		100 μ L
058-09261	EV-Save™ 細胞外小胞ブロッキング試薬	1mL

【18. 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

2307KA5