



【III】 Kit Components

Storage temperature : 4°C

No	Component	Volume	Quantity
1	EV Detection Plate	8-well × 12 strips	1 plate
2	Lactobacillus EVs Standard (<i>Lactobacillus paracasei</i> 180913-R1 strain) 1.28×10^7 particles/mL	1.0 mL	1 vial*
3	Assay Buffer	35 mL	1 bottle
4	Wash Buffer (10X)	40 mL	1 bottle
5	Anti-LTA Antibody (100X, red cap)	120 µL	1 vial
6	HRP-labeled Secondary Antibody (200X, green cap)	150 µL	1 vial
7	Substrate Solution	12 mL	1 bottle
8	Stop Solution	6 mL	1 bottle
9	Plate Seal		3 sheets

* Standard curve can be prepared twice (n=2)

Materials required but not provided

- Micropipettes (10 – 1000 µL)
- Multichannel pipette
- Reservoir
- Plate shaker
- Plate reader (capable of measuring at 450 nm)
- Plate washer

【IV】 Preparation of Reagents and Samples

【IV-1】 EV Standards (prepare for 2 wells per plate)

	Concentration (particles/mL)	EVs Standard	Assay Buffer	Dilution
A	1.28×10^7			1
B	6.40×10^6	250 µL of A	250 µL	2
C	3.20×10^6	250 µL of B	250 µL	2
D	1.60×10^6	250 µL of C	250 µL	2
E	8.00×10^5	250 µL of D	250 µL	2
F	4.00×10^5	250 µL of E	250 µL	2

Preparation of Standard Solutions

1. Add 250 µL of Assay Buffer to 250 µL of the EVs Standard Solution included in the kit (A in the table above) to make a 2-fold dilution. Mix well to obtain solution B.
2. Prepare subsequent 2-fold serial dilutions in the same manner.
3. Use 100 µL of each dilution per well.

Note: Since each concentration is measured in duplicate (n = 2), 200 µL of each dilution will be required.

Caution: Prepare the EVs Standard Solution freshly at the time of use, and only in the amount needed.



【IV】 Reagents and Sample Preparation (cont.)

【IV-2】 Wash Buffer

- Dilute Wash Buffer (10X) 10-fold with purified water.

Example: For one plate, dilute 40 mL Wash Buffer (10X) with 360 mL purified water.

【IV-3】 Anti-LTA Antibody

- Dilute Anti-LTA Antibody (100X) 100-fold with Assay Buffer.

Example: For one plate, dilute 100 µL Anti-LTA Antibody (100X) with 10 mL Assay Buffer.

Caution: Prepare the antibody solution freshly at the time of use, and only in the required amount.

【IV-4】 HRP-labeled Secondary Antibody

- Dilute HRP-labeled Secondary Antibody (200X) 200-fold with Assay Buffer.

Example: For one plate, dilute 50 µL HRP-labeled Secondary Antibody (200X) with 10 mL Assay Buffer.

Caution: Prepare the antibody solution freshly at the time of use, and only in the required amount.

【IV-5】 Samples

- Dilute samples at least 2-fold with Assay Buffer so that the total reaction volume becomes 100 µL
- EVs may not be captured if the solvent contains high salt concentrations. Replace or dilute the solvent with phosphate buffer or an equivalent buffer to reduce the salt concentration to 150 mM or lower.
- For some samples, the relationship between concentration and absorbance may not be linear even if within the calibration curve. Prepare multiple dilutions to confirm linearity.

【V】 Assay Procedure

- ① Bring EV Detection Plate and reagents to room temperature.
- ② Prepare EV standards as described in [IV-1].
- ③ Add 100 µL of prepared EV standards (4.00×10^5 to 1.28×10^7 particles/mL) or sample solution to each well.
- ④ Seal the plate and shake with a plate shaker (800 rpm, 30 seconds).
- ⑤ Incubate at room temperature for 2 hours or overnight at 4° C.
- ⑥ Remove reaction solution completely, add 300 µL Wash Buffer (see [IV-2]) to each well, and wash. Repeat 3 times.
- ⑦ Add 100 µL of diluted Anti-LTA Antibody (see [IV-3]) to each well.
- ⑧ Seal the plate, shake at 800 rpm for 30 seconds, and incubate at room temperature for 2 hours.
- ⑨ Remove antibody solution completely, wash each well 3 times with 300 µL Wash Buffer.
- ⑩ Add 100 µL of diluted HRP-labeled Secondary Antibody (see [IV-4]) to each well.



【V】 Assay Procedure (cont.)

- ⑪ Seal the plate, shake at 800 rpm for 30 seconds, and incubate at room temperature for 2 hours.
- ⑫ Remove antibody solution completely, wash each well 3 times with 300 μ L Wash Buffer.
- ⑬ Add 100 μ L of Substrate Solution to each well and incubate at room temperature for about 20 minutes, or until sufficient color develops.
- ⑭ After confirming the color intensity, add 50 μ L of Stop Solution to each well.
- ⑮ Measure absorbance of each well with a plate reader at 450 nm.
- ⑯ Draw a calibration curve using the concentrations and absorbance of standards, and calculate the concentrations of the samples.

【VI】 References

1. Y. Naito, Y. Yoshioka, Y. Yamamoto and T. Ochiya: Cell Mol Life Sci., 74, 697 (2017).
2. Obana, N., Kurosawa, M., Toyofuku, M. & Nobuhiko, N. Biogenesis and Functions of Membrane Vesicles Actively Produced by Microbes. KAGAKU TO SEIBUTSU 54, 812–819 (2016).191.
3. Obana, N. & Nomura, N. Functions and biosynthesis of membrane vesicles produced actively by Gram-positive bacteria. Japanese J. Lact. Acid Bact. 27, 10–16 (2016).

【VII】 Notes

Examples are available online.

Please search "Gram-positive bacterial EV ELISA" on our website.



COSMO BIO CO., LTD.

【JAPAN】

TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,
KOTO-KU, TOKYO 135-0016, JAPAN
Phone: +81-3-5632-9610
FAX: +81-3-5632-9619
URL: [https://www.cosmobio.co.jp/](http://www.cosmobio.co.jp/)



COSMO BIO USA

【Outside Japan】

2792 Loker Ave West, Suite 101
Carlsbad, CA 92010, USA
email: support@cosmobiousa.com
URL: www.cosmobiousa.com
Phone/FAX: (+1) 760-431-4600

13746



一般研究用キット

Gram-positive bacterial EV ELISA Kit

グラム陽性菌由来 EV 定量用 ELISA キット

Cat. No. EVEL01

2025 年 10 月 31 日作成

www.cosmobioc.jp

【I】背景と測定原理

細胞外小胞 (extracellular vesicle : EV) は細胞から放出される脂質二重膜を持つ粒子の総称で、細胞間の情報伝達に重要な役割を果たすとされ⁽¹⁾、盛んに研究されています。

多細胞生物ばかりでなく、微生物においても EV は微生物 - 微生物間、さらには微生物 - 宿主細胞間の情報伝達を担っていることが明らかになっています⁽²⁾。EV 産生は微生物にとって不可欠な機能であり、EVs による細菌間もしくは宿主との相互作用の機能解明は、ワクチン開発のシーズや腸内における細菌の宿主への作用、ドラッグデリバリーシステムといった様々な応用分野への展開が期待されています⁽³⁾。

多細胞生物の EV 定量においてはマーカータンパク質に対する抗体を用いた ELISA キットが多く開発されています。一方で微生物の場合はマーカータンパク質の同定が進んでいないことからナノトラッキング解析による定量が主流であり、高価な装置が必要となっています。

本製品は、表面に正電荷を帯びるようコーティングしたプレートで EV を捕捉し、抗 LTA (Lipoteichoic acid) 抗体をプローブとすることで、高価な装置や特殊な手技を必要とせずにグラム陽性菌由来の EV を高感度に相対定量することができます。

【II】製品の特長

- 通常の ELISA 法と同様の操作で微生物由来 EV の相対定量が可能です。
- 標品が付属しているのですぐに実験を始められます。
- 高感度なので少量のサンプルで測定可能です。

検出限界 : 4.0×10^5 particles/mL

※溶媒に高濃度の塩を含む場合プレートに補足できない可能性があります。

塩濃度が 150mM 以下になるようリン酸バッファーなどで溶媒置換もしくは希釀してご使用ください。

【III】キット構成品

保存温度：4°C

No	内 容	数量	取扱上の注意
1	EV Detection Plate	8-well × 12 strips × 1 枚	取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。
2	乳酸菌 EV 標準液 (<i>Lactobacillus paracasei</i> 180913-R1 株由来) 1.28×10^7 particles/mL	1.0 mL × 1 本 *	
3	アッセイバッファー	35 mL × 1 本	
4	洗浄バッファー (10X)	40 mL × 1 本	
5	抗 LTA 抗体 (100X) 赤キャップ	120 μL × 1 本	
6	HRP 標識二次抗体 (200X) 緑キャップ	150 μL × 1 本	
7	基質液	12 mL × 1 本	
8	停止液	6 mL × 1 本	
9	プレートシール	3 枚	

* n=2 として、検量線 2 回分

ご準備いただくもの（その他必要なもの）

- マイクロピッパー (10 ~ 1000 μL)
- リザーバー
- プレートリーダー (波長 450 nm が測定可能なもの)
- マルチチャンネルピッパー
- プレートシェーカー
- プレートウォッシャー

【IV】試薬、サンプルの調製方法

【IV-1】EV 標準液（プレート 1 枚あたり 2 ウェル分ずつ調製）

	濃度 (particles/mL)	標準タンパク質	アッセイバッファー	希釀率
A	1.28×10^7			1
B	6.40×10^6	250 μL of A	250 μL	2
C	3.20×10^6	250 μL of B	250 μL	2
D	1.60×10^6	250 μL of C	250 μL	2
E	8.00×10^5	250 μL of D	250 μL	2
F	4.00×10^5	250 μL of E	250 μL	2

キットに入っている EV 標準液（上表の A）250 μL にアッセイバッファー 250 μL を加え（2 倍希釀）、

よく混合した溶液を B とします。以下、同様に 2 倍希釀した溶液を調製し、100 μL ずつ測定して下さい。

各濃度 n=2 では、100 μL × 2 = 200 μL 使用します。

* EV 標準液は、必要量を用時調製してください。

【IV-2】洗浄バッファー

- ・洗浄バッファー (10X) を精製水で 10 倍希釈します。

例) プレート 1 枚分 : 洗浄バッファー (10X) 40 mL に精製水 360 mL を加え、混合します。

【IV-3】抗 LTA 抗体

- ・抗 LTA 抗体 (100X) をアッセイバッファーで 100 倍希釈します。

例) プレート 1 枚分 : アッセイバッファー 10 mL に抗 LTA 抗体 (100X) を 100 μ L を加え、転倒混和します。

* 抗体溶液は、必要量を用時調製してください。

【IV-4】HRP 標識二次抗体

- ・HRP 標識二次抗体 (200X) をアッセイバッファーで 200 倍希釈します。

例) プレート 1 枚分 : アッセイバッファー 10 mL に HRP 標識二次抗体 (200X) を 50 μ L を加え、転倒混和します。

* 抗体溶液は、必要量を用時調製してください。

【IV-5】サンプル

- ・サンプルはアッセイバッファーで 2 倍以上に希釈し、総反応液量が 100 μ L になるよう調製してください。
- ・溶媒に高濃度の塩を含む場合プレートに補足できない可能性があります。塩濃度が 150mM 以下になるようリン酸バッファーなどで溶媒置換もしくは希釈してご使用ください。
- ・サンプルによっては測定値が検量線の範囲内に入っていても濃度と吸光度の関係がリニアにならない場合があります。サンプルは複数濃度の希釈を行い、リニアリティーを確認するようにしてください。

【V】測定方法

- ① EV Detection Plate と試薬を室温に戻します
- ② EV 標準液を希釈調製します (【IV-1】)。
- ③ ②で希釈調製した EV 標準液 ($4.00 \times 10^5 \sim 1.28 \times 10^7$ particles / mL) もしくはサンプル溶液を各ウェルに 100 μ L ずつプレートへ加えます。
- ④ プレートにシールし、プレートシェーカーで攪拌 (800 rpm, 30 秒) します。
- ⑤ 室温で 2 時間静置もしくは 4°C で一晩反応します。
- ⑥ 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 μ L の洗浄バッファー (【IV-2】) を加え、洗浄します。この操作を 3 回行って下さい。
- ⑦ 希釈調製した 抗 LTA 抗体 (【IV-3】) を各ウェルに 100 μ L ずつ加えます。
- ⑧ プレートにシールし、プレートシェーカーで攪拌 (800 rpm, 30 秒) します。
- ⑨ 室温で 2 時間静置反応します。
- ⑩ 抗体溶液を完全に除去し、各ウェルに 300 μ L の洗浄バッファーを加え、洗浄します。この操作を 3 回行って下さい。

【V】測定方法 つづき

- ⑪ 希釀調製した HRP 標識二次抗体（【IV-4】）を各ウェルに 100 μ L ずつ加えます。
- ⑫ プレートにシールし、プレートシェーカーで攪拌 (800 rpm, 30 秒) します。
- ⑬ 室温で 2 時間静置反応します。
- ⑭ 二次抗体溶液を完全に除去し、各ウェルに 300 μ L の洗浄バッファーを加え、洗浄します。
この操作を 3 回行って下さい。
- ⑮ 基質液を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、室温で 適度に発色するまで 20 分程度静置反応します。
- ⑯ 発色の濃度を確認後、各ウェルに 50 μ L ずつ停止液を加えます。
- ⑰ プレートリーダーにて各ウェルの吸光度を測定します（測定波長 450 nm）。
- ⑱ 標準液の濃度と吸光度から検量線を描き、サンプルの濃度を算出します。

標準液測定例

濃度 particles / mL	1.28×10^7	6.40×10^6	3.20×10^6	1.60×10^6	8.00×10^5	4.00×10^5	Blank
450nm 吸光度	0.9310	0.5205	0.3247	0.2134	0.1550	0.1171	0.0934

【VI】参考文献

- [1] Y. Naito, Y. Yoshioka, Y. Yamamoto and T. Ochiya: Cell Mol Life Sci., 74, 697 (2017).
- [2] Obana, N., Kurosawa, M., Toyofuku, M. & Nobuhiko, N. Biogenesis and Functions of Membrane Vesicles Actively Produced by Microbes. KAGAKUTO SEIBUTSU 54, 812-819 (2016).191.
- [3] Obana, N. & Nomura, N. Functions and biosynthesis of membrane vesicles produced actively by Gram-positive bacteria. Japanese J. Lact. Acid Bact. 27, 10-16 (2016).

実施例は WEB で公開中です。

弊社ホームページ ([https://www.cosmobio.co.jp](http://www.cosmobio.co.jp)) 内の検索、または検索サイトより、
「Gram-positive bacterial EV ELISA」と入力し、検索ください。

本商品をご利用になられた文献、発表データを募ってあります。

本商品をご利用いただいたて投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。
ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合
がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付方法

郵 送

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
コスモ・バイオ株式会社 製品情報部 宛

E-mail

tech@cosmobio.co.jp

※ PDF ファイルにてお送りください。

13746



コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : [https://www.cosmobio.co.jp/](http://www.cosmobio.co.jp/)

● 営業部（お問い合わせ）

TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620