



一般研究用キット

# Bovine Milk Exosome ELISA Kit

## ウシ由来ミルクエクソソーム ELISA キット

Cat. No. EXBMEL

2024年11月12日作成

[www.cosmobio.co.jp](http://www.cosmobio.co.jp)

### 【1】キットについて

#### 【1-1】背景と測定原理

Exosome(エクソソーム)は、ほとんどの細胞で分泌される直径 50 nm ~ 150 nm 程度の膜小胞で、生体内では唾液、血液、尿、羊水、悪性腹水等の体液中で観察され、また培養細胞から分泌されていることも確認されています。このエクソソームは、miRNA や mRNA、タンパク質、マイクロペプチドなどを内包し、由来する細胞や組織から離れた別の標的細胞や組織へと情報を伝達する役割を担うことが示唆されている<sup>1)</sup>ものの、その標的指向性はまだ完全には明らかになっていません。一方で、エクソソームによる情報伝達を CD9、CD63 といったエクソソーム表面抗原特異的な抗体で中和することにより、がん転移を抑制できることがわかっています。<sup>2)</sup>

ヒト、ウシ、ラットなどの広範な動物の乳中にもエクソソームが存在し、miRNA や mRNA、タンパク質などを内包し、標的細胞へ取り込まれることによってそれらが機能することが示唆されています。<sup>3)</sup>

さらに最近の研究では、前述のようなエクソソームの性質を利用して、ドラッグデリバリー担体 (DDS) としての研究もおこなわれており、とくに、牛乳由来のエクソソームは、抗がん剤の経口投与手段としても注目されています。<sup>4)</sup>

本製品は、抗ウシミルクエクソソーム抗体をキャプチャー抗体とし、エクソソーム・マーカーのひとつである抗 CD81 モノクローナル抗体を検出用抗体としたサンドイッチ ELISA キットです。健康な牛から採取された生乳から超遠心分離法により調製したエクソソーム画分を標準エクソソームとして、ウシミルクやウシ血清といった検体中のエクソソームを定量することができます。

#### 【1-2】キットの特長

- ◆ ウシミルク、ウシ血清などに含まれるエクソソームを直接定量可能
- ◆ 特殊な装置は不要、通常のプレートリーダーで測定可能 (波長: 450nm)
- ◆ 超遠心精製法により分画したウシ由来ミルクエクソソームを標準品として添付

#### 【1-3】キット構成

本製品は 96 検体を測定できます。

内容	容量	数量	保存温度	取扱上の注意
固相化抗体 (×100)	100 μL	1 本	4°C ~ 10°C	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。
固相化抗体希釈液	10 mL	1 本		
96well プレート	8-well x 12 strips	1 枚		
プレートシール		3 枚		
アッセイバッファー	50 mL	1 本		
洗浄液 (×10)	50 mL	1 本		
ミルクエクソソーム原液 (450 μg/mL)	200 μL	1 本		
ビオチン化・抗 CD81 抗体 (×100)	50 μL	1 本		
HRP 標識アビジン (×100)	100 μL	1 本		
発色基質溶液	12 mL	1 本		



**Bovine Milk Exosome ELISA Kit**  
—ウシ由来ミルクエクソソーム ELISA キット—  
Cat. No. EXBMEL

www.cosmobio.co.jp

内容	容量	数量	保存温度	取扱上の注意
反応停止液	12 mL	1 本	4℃～10℃	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。

## 【I-4】ご準備いただくもの（その他必要なもの）

- マイクロピペット (10～1000 $\mu$ L)
- マルチチャンネルピペット
- リザーバー
- プレートシェーカー
- プレートリーダー

## 【II】測定方法

### 【II-1】固相化抗体溶液の調製

固相化抗体を固相化抗体希釈液にて 100 倍希釈します。

### 【II-2】洗浄液の調製

洗浄液 ( $\times 10$ ) を精製水で 10 倍希釈します。

### 【II-3】ミルクエクソソーム標準液の調製

以下の表に準じてミルクエクソソーム標準液 (A～H) を調製します。

	濃度 ( $\mu$ g/mL)	液量	アッセイバッファー	希釈率
ミルクエクソソーム原液	450			
A	100	原液を 100 $\mu$ L	350 $\mu$ L	4.5
B	50	A を 210 $\mu$ L	210 $\mu$ L	2
C	25	B を 210 $\mu$ L	210 $\mu$ L	2
D	12.5	C を 210 $\mu$ L	210 $\mu$ L	2
E	6.25	D を 210 $\mu$ L	210 $\mu$ L	2
F	3.125	E を 210 $\mu$ L	210 $\mu$ L	2
G	1.5625	F を 210 $\mu$ L	210 $\mu$ L	2
H	0		210 $\mu$ L	

・キット内のミルクエクソソーム原液 100  $\mu$ L にアッセイバッファー 350  $\mu$ L を加え (4.5 倍希釈)、よく混合した溶液を A とします。この A 溶液 210  $\mu$ L にアッセイバッファー 210  $\mu$ L を加え (2 倍希釈)、よく混合した溶液を B とします。以下、同様に 2 倍希釈系列を調製します。

・上表に準じて調製されたミルクエクソソーム標準液は各濃度とも 1 well 分 50  $\mu$ L とし 4 well 分あります。希釈調製された標準液は 4℃ で 2 週間保存可能です。

### 【II-4】検体の調製

・ウシミルクおよびウシ血清の場合  
ウシミルクあるいはウシ血清 100  $\mu$ L にアッセイバッファー 100  $\mu$ L を加えて攪拌後、アッセイバッファーで 5 倍希釈系列を調製し、ELISA 測定の結果が標準曲線の中心付近の吸光度になるところを採用してください。

## 【II -5】ビオチン化・抗 CD81 抗体溶液の調製

・ビオチン化・抗 CD81 抗体 (× 100) をアッセイバッファーで 100 倍希釈して使用ください。

## 【II -6】HRP 標識アビジン溶液の調製

・HRP 標識アビジン (× 100) をアッセイバッファーで 100 倍希釈して使用ください。

## 【III】測定フロー

・必要な数の well を準備してください。測定はすべてデュプリケートで行ってください。

- 1 【II -1】で調製した固相化抗体溶液を 100  $\mu$ L/well 入れてください。  
→ プレートシールをして、室温にて 1 時間インキュベートします (固相化)。
- 2 固相化抗体を捨ててください。
- 3 【II-2】で調製した洗浄液 (300  $\mu$ L/well) で 3 回洗います。
- 4 アッセイバッファーを 200  $\mu$ L/well 入れてください (ブロッキング)。  
プレートシールをして、プレートシェーカーで攪拌 (800rpm) しながら室温で 1 時間インキュベートします。
- 5 アッセイバッファーを捨ててください。
- 6 洗浄液 (300  $\mu$ L/well) で 3 回洗います。  
→ 洗浄 3 回目の溶液を捨てずにおき、標準液および検体の調製 (【II-3】および【II-4】) を行います。
- 7 標準液および検体を 50  $\mu$ L/well 入れ、次いで【II-5】で調製したビオチン化・抗 CD81 抗体溶液を 50  $\mu$ L/well 入れます。プレートシールをしてプレートシェーカーで攪拌 (800rpm) しながら室温で 1 時間インキュベートします。
- 8 洗浄液 (300  $\mu$ L/well) で 3 回洗います。
- 9 【II-6】で調製した HRP 標識アビジン溶液を 100  $\mu$ L/well 入れます。プレートシールをして、プレートシェーカーで攪拌 (800rpm) しながら室温で 1 時間インキュベートしてください。
- 10 洗浄液 (300  $\mu$ L/well) で 3 回洗います。
- 11 発色基質溶液を 100  $\mu$ L/well 入れ、プレートシールをして、室温で 15 分間インキュベートします。
- 12 反応停止液を 100  $\mu$ L/well 入れ、波長 450nm で測定してください。

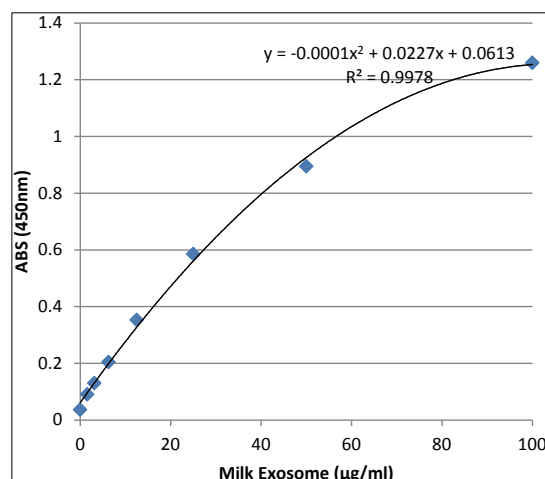


図 1. 標準曲線の例

2 次曲線回帰 (左記グラフ) で近似曲線を作成する。



**Bovine Milk Exosome ELISA Kit**  
—ウシ由来ミルクエクソソーム ELISA キット—

Cat. No. EXBMEL

**【III】 測定例**

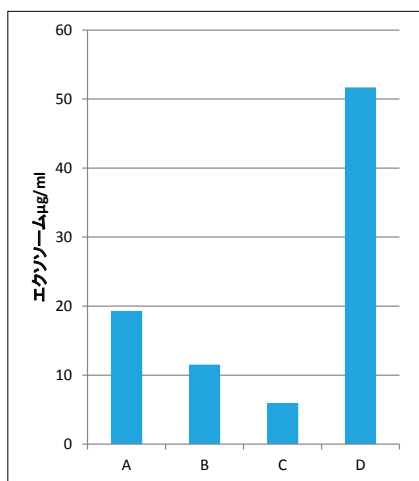


図2. ウシミルク中のエクソソームの測定例  
ウシミルク間でエクソソーム含量に違いあることが分かった。

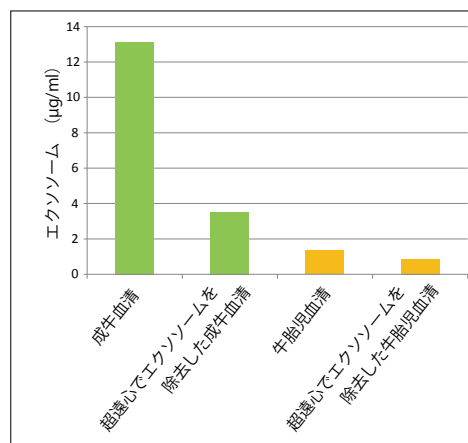


図3. ウシ血清中のエクソソームの測定例  
エクソソーム濃度は成牛血清濃度が高く、超遠心でエクソソームを除去すると低くなった。これに比べ牛胎児血清はエクソソーム含量が低いことが分かった。

**【VI】 参考文献**

- [1] Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis, Hoshino A, *et al.*, *Nature*. 2015 Nov 19; **527**(7578): 329-35.
- [2] Disruption of Circulating Extracellular Vesicles as a Novel Therapeutic Strategy against Cancer Metastasis, Nao Nishida-Aoki, *et al.*, *Mol Ther*. 2017 Jan 4; **25**(1): 181-191.
- [3] Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages, Hirohisa Izumi, *et al.*, *J Dairy Sci*. 2015 May; **98**(5): 2920-33
- [4] Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel, Ashish K.Agrawal *et al.*, *Nanomedicine*. 2017 Jul; **13**(5): 1627-1636.

**【VII】 関連商品**

メーカー略号	品番	品名	包装
CAC	SHI-EXO-M03	Anti CD81, Human (Mouse)	100 µL (1mg/mL)
	EXO-AB-01	Anti Bovine Milk Exosome	0.1 mg
CSR	EXBM100L	牛乳由来エクソソーム	100 µL × 10 本
	EXBM1000L		1 mL × 10 本

