

一般研究用キット

Gram-negative bacterial EV ELISA Kit

グラム陰性菌由来 EV 定量用 ELISA キット

Cat. No. EVEL02

2023年3月1日作成

www.cosmobio.co.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 LPS (Lipopolysaccharide) 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グラム陰性菌由来の EV を高感度に相対定量することが可能です。

【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： 8.0×10^6 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釈してご使用ください。

【Ⅲ】キット構成品

保存温度：4℃

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	大腸菌 EV 標準液 (<i>Escherichia coli</i> DH5 α 株由来) 5.12 × 10 ⁸ 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 LPS 抗体 (100X) 赤キャップ	120 μ L × 1 本	
6	HRP 標識二次抗体 (200X) 緑キャップ	150 μ L × 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)

- マイクロピペッター (10 ~ 1000 μ L)
- マルチチャンネルピペッター
- リザーバー
- プレートシェーカー
- プレートリーダー (波長 450 nm が測定可能なもの)
- 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	希釈率
A	5.12 × 10 ⁸			1
B	2.56 × 10 ⁸	250 μ L of A	250 μ L	2
C	1.28 × 10 ⁸	250 μ L of B	250 μ L	2
D	6.40 × 10 ⁷	250 μ L of C	250 μ L	2
E	3.20 × 10 ⁷	250 μ L of D	250 μ L	2
F	1.60 × 10 ⁷	250 μ L of E	250 μ L	2
G	8.00 × 10 ⁶	250 μ L of F	250 μ L	2

キットに入っている EV 標準液 (上表の A) 250 μ L にアッセイバッファー 250 μ 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 倍希釈した溶液を調製し、100 μ L ずつ測定して下さい。各濃度 n=2 では、100 μ L × 2 = 200 μ L 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】 試薬、サンプルの調製方法 つづき

【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 LPS 抗体

- ・抗 LPS 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 LPS 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 ($8.00 \times 10^6 \sim 5.12 \times 10^8$ 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 $^{\circ}$ 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 LPS 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 希釈調製した 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 15 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	5.12 x 10 ⁸	2.56 x 10 ⁸	1.28 x 10 ⁸	6.40 x 10 ⁷	3.20 x 10 ⁷	1.60 x 10 ⁷	8.00 x 10 ⁶	Blank
450nm 吸光度	1.9703	0.9929	0.6019	0.3570	0.2616	0.1719	0.1504	0.1081

【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. 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).

実施例は WEB で公開中です。

弊社ホームページ (<http://www.cosmobio.co.jp>) 内の検索、または検索サイトより、「Gram-negative 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おります。

本商品をご利用いただき投稿された論文、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。

