

CD9/CD9 Exosome ELISA Kit, Dog

イヌ由来エクソソーム定量用 CD9/CD9 ELISA キット

【I】キットについて

【I-1】背景と測定原理

エクソソームは生体を構成するほぼすべての細胞から分泌される直径 30~200nm の小胞で、血液や尿などあらゆる体液中に存在します^{1~5}。また、in vitro では動物細胞の培養上清にも分泌されます。エクソソームは細胞と同様に脂質二重膜に包まれており、その表面には膜タンパクが存在し、また、内部にはタンパク質やマイクロ RNA などが含まれています。エクソソームを取り込んだ標的細胞において、これらのタンパク質やマイクロ RNA が機能することによって、エクソソームは細胞間のコミュニケーションを担っていると考えられます⁶。エクソソームの構造上の特徴の一つとして表面上に存在するテトラスパンニンファミリーが挙げられます。イヌにおいても CD9 や CD63 はそのメンバー分子で、エクソソームの表面マーカーとして存在しています^{7,8}。

エクソソームの定量法としては、エクソソームが含むタンパク量で代替したり、ナノトラッキング法による粒子解析がありますが⁹、これらの方法は超遠心法などで一旦エクソソームを精製する必要があります。体液中や細胞培養液中のエクソソームを直接定量する手段は極めて限られており、これまで一般的な方法は開発されてきませんでした。

本キットは、エクソソーム・マーカーであるイヌ CD9 に対する高性能抗体を用いた 2 ステップサンドイッチ ELISA により、表面にイヌ CD9 分子を持つエクソソームを相対的に定量することができます。

【I-2】キットの特長

- ・血液サンプルや細胞培養上清などに含まれるエクソソームを直接定量できます。
- ・特殊な装置は不要で、通常のプレートリーダーがあれば測定できます(波長 450nm)。
- ・標準試薬として安定化させた AZ-ACU(イヌ尿路上皮癌細胞)由来エクソソームを使用しております。

本品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。 本マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。

- ・エクソソームスタンダードにより補正することで各サンプルの相対定量が可能です。
- ・固相化したイヌ CD9 抗体でエクソソームを捕捉し、HRP 標識したイヌ CD9 抗体で検出します。

【I-3】キットの原理



この ELISA キットは 2 ステップサンドイッチ法を原理としています。

キットの ELISA プレートは抗イヌ CD9 抗体が予め固相されていて、検体を加えると検体中のエクソソームがトラップされます。洗浄後、トラップされたエクソソーム表面の別のイヌ CD9 に対して HRP 標識した抗イヌ CD9 抗体を反応させ、基質添加後 HRP による発色をプレートリーダーで読み取り定量化します。

【I-4】構成

保存温度：冷蔵（2～8℃）

	内容	容量	数量	危険表記および取扱上の注意
1	抗イヌ CD9 抗体 固相化プレート (96well)	8well x 12 strips	1 枚	成分は労働安全衛生法に非該当ですが、取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体への接触を避けるよう十分に配慮してください。
2	エクソソームスタンダード	乾燥品	4 本*	
3	アッセイバッファー	25mL	1 本	
4	洗浄バッファー (10 倍濃縮)	25mL	1 本	
5	HRP 標識抗イヌ CD9 抗体 (500 倍濃縮)	20μL	1 本	
6	基質液	12mL	1 本	

7	停止液(2N H ₂ SO ₄)	6mL	1 本	(成分として硫酸を 9.8%含む) 労働安全衛生法 第 57 条および第 57 条の 2 に該当 危険    ・吸入すると有害（気体、蒸気、ミスト） ・重篤な皮膚の薬傷及び眼の損傷 ・重篤な眼の損傷 ・呼吸器系の障害のおそれ ・長期にわたる、又は反復ばく露による呼吸器系の障害のおそれ
8	プレートシール		2 枚	

*n=2 として、検量線 4 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(10～1000μL)
- ・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 450nm が測定可能なもの）
- ・プレートウォッシャー

【Ⅱ】試薬、サンプルの調製方法

【Ⅱ-1】洗浄バッファーの調製

洗浄バッファー(10 倍濃縮)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(10 倍濃縮)25mL に精製水 225mL を加え、混合します。

【Ⅱ-2】エクソソームスタンダードの希釈調製（プレート 1 枚あたり 2 ウェル分ずつ調製）

	エクソソームスタンダード濃度(ng/mL)	エクソソームスタンダード	アッセイバッファー	希釈率
A	200	1vial	500μL	
B	100	250μL of A	250μL	2
C	50	250μL of B	250μL	2
D	25	250μL of C	250μL	2
E	12.5	250μL of D	250μL	2
F	6.25	250μL of E	250μL	2
G	3.13	250μL of F	250μL	2

キットに入っているエクソソームスタンダード 1 本にアッセイバッファー 500μl を加え、よく混和した溶液を A（上表の A）とします。この A 溶液 250μL にアッセイバッファー 250μL 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、100μL ずつ測定して下さい。各濃度 $n=2$ では、 $100\mu\text{L} \times 2 = 200\mu\text{L}$ 使用します。

希釈調製したエクソソームスタンダード (3.13~200ng/mL) は、必要量を用時調製してください。

【Ⅱ-3】抗体の調製

HRP 標識抗イヌ CD9 抗体(500 倍濃縮)をアッセイバッファーで 500 倍希釈します。

例) プレート 1 枚分：アッセイバッファー 10mL に HRP 標識抗イヌ CD9 抗体(500 倍濃縮) 20μL を加え、転倒混和します。希釈調製した HRP 標識抗イヌ CD9 抗体、必要量を用時調製してください。

【Ⅱ-4】サンプル調製（血清/血漿サンプル）

血清または血漿はアッセイバッファーを用いて 40 倍に希釈し、これをサンプルとして測定します。

更に希釈が必要な場合はアッセイバッファーで希釈して下さい。

【Ⅱ-4】サンプル調製（細胞培養上清）

10% ウシ胎児血清（FBS）を含む培地 による細胞培養上清に含まれるエクソソームを直接定量することができます。細胞をコンフルエントになるまで培養後、 $2000 \times g$ 、10 分間遠心した上清をサンプルとしてください。希釈が必要な場合はアッセイバッファーで希釈して下さい。

【Ⅱ-6】 サンプルの保存

サンプル調製後測定までは 2～8℃で保存して下さい。

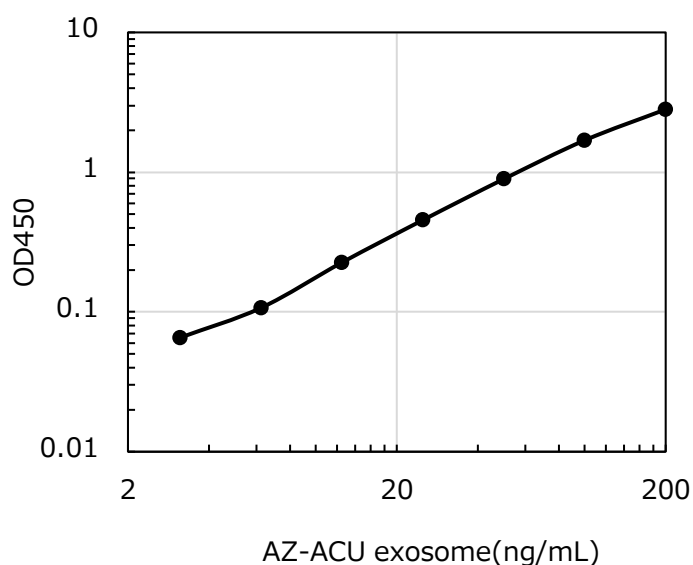
【Ⅲ】 測定方法

1. 抗イヌ CD9 抗体固相化プレートと試薬を室温に戻します。
2. エクソソームスタンダードを希釈調製します（【Ⅱ-2】）。
3. 2 で希釈調製したエクソソームスタンダード (3.13～200ng/mL)もしくはサンプル溶液を 1 ウェルあたり 100μL 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(800rpm, 30 秒)します。
5. 室温で 2 時間攪拌(800rpm)して反応します。
6. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300μL の洗浄バッファー（【Ⅱ-1】）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 HRP 標識抗イヌ CD9 抗体（【Ⅱ-3】）を各ウェルに 100μL 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(800rpm, 30 秒)します。
9. 室温で 2 時間攪拌(800rpm)して反応します。
10. 抗体溶液を完全に除去し、各ウェルに 300μL の洗浄バッファー（【Ⅱ-1】）を加え、洗浄します。この操作を 3 回行って下さい。
11. 基質液を各ウェルに 100μL ずつ加え、室温で遮光して 20 分間静置反応します。
12. 発色の濃度を確認後、各ウェルに 50μL ずつ停止液を加えます。
13. 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：450nm）。
14. 横軸に標準タンパク質濃度、縦軸に吸光度を取り、標準曲線を描きます。
15. サンプル溶液から得られた吸光度を標準曲線に対応させ、エクソソームスタンダード(ng/mL)相当量としてサンプル溶液中のイヌ CD9 エクソソーム濃度(Unit/mL)を算出し、希釈倍数を乗じます。

【Ⅳ】 測定例

【Ⅳ-1】 標準曲線

一例として、エクソソームスタンダードに対する吸光度(OD450)をグラフに描くと図 1 のようになります。ただし、アッセイ毎に新たな標準曲線を描いて、サンプル中の濃度を算出してください。



(各標準タンパク質濃度の吸光度からブランク吸光度を差し引いた値をプロットしています)

エクソソーム スタンダード (ng/mL)	吸光度(450nm)		平均吸光度	濃度計算値 (U/mL)
	1	2		
0	0.115	0.103	0.109	
3.13	0.179	0.170	0.175	
6.25	0.213	0.219	0.216	
12.5	0.331	0.339	0.335	
25	0.546	0.581	0.564	
50	1.013	0.992	1.003	
100	1.767	1.834	1.801	
200	2.870	2.976	2.923	
血清	0.302	0.315	0.309	11.5

図1 エクソソームスタンダードによる標準曲線およびサンプル測定

【参考文献】

- 1) J. Skog, T. Wurdinger, S. van Rijn, D. H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W. T. Jr. Curry, B. S. Carter, A. M. Krichevsky and X. O. Breakefield: Nat Cell Biol., 10, 1470 (2008).
- 2) T. Pisitkun, R. F. Shen and M. A. Knepper: Proc Natl Acad Sci USA., 101, 13368 (2004).

- 3) S. Runz, S. Keller, C. Rupp, A. Stoeck, Y. Issa, D. Koensgen, A. Mustea, J. Sehouli, G. Kristiansen and P. Altevogt: *Gynecol Oncol.*, 107, 563 (2007).
- 4) S. Keller, A. K. Konig, F. Marme, S. Runz, S. Wolterink, D. Koensgen, A. Mustea, J. Sehouli and P. Altevogt: *Cancer Lett.*, 278, 73 (2009).
- 5) C. Lasser, V. Seyed AlikhS. Gabrielsson, J. Lotvall and H. Valadi: *J Transl Med.*, 9, 9 (2011).
- 6) Y. Naito, Y. Yoshioka, Y. Yamamoto and T. Ochiya: *Cell Mol Life Sci.*, 74, 697 (2017).
- 7) E. J. Fish, K. J. Irizarry, P. DeInnocentes, et al.: *BMC Cancer.*, 18, 832 (2018).
- 8) M. A. Rojas, B. B. Rentzsch, J. Plendl, et. al.: *BMC Vet Res.*, 14, 179 (2018).
- 9) V. Filipe, A. Hawe and W. Jiskoot: *Pharm Res.*, **27**, 796 (2010).

CD9/CD9 Exosome ELISA Kit, Dog

【 I 】 About this kit

【 I – 1 】 Background and Measurement Principal

Exosomes are membrane vesicles, which are secreted from many cells and have a diameter of about 30 nm ~ 200 nm. They are present in many bodily fluids, including saliva and blood^{1) ~ 5)}. It is also known that exosomes are secreted into the mammalian cell culture medium in vitro. Exosomes are enveloped with a lipid bilayer membrane, so like cells, membrane proteins exist at their surface, and they encase various molecular constituents, including proteins and microRNAs. When the target cells receive the exosomes, the proteins or microRNAs inside will fulfill their function, and in this way exosomes are thought to play a role of cell-to-cell communication⁶⁾. One of the exosomes' structural characteristics is the tetraspanin family which is located on their surface. Even in dogs, CD9 and CD63 are member molecules of this family, and known to be exosome surface markers^{7,8)}.

The conventional way to quantify exosomes is indirect. For example, it measures encapsulated protein abundance or performs Nanoparticle Tracking Analysis to determine the size distribution profile of small particles⁹⁾. The drawback for these methods is that they require exosome purification utilizing ultracentrifugation, for instance. The direct methods to quantitate exosomes in body fluids or culture supernatant is extremely limited, and there were no common methods available until now. The CD9/CD9 Exosome ELISA Kit is a Sandwich ELISA kit, which utilizes high-performance anti-dog CD9 antibodies. This product detects exosome markers, dog CD9 molecules that are located on the exosome surface in the body fluids or cell culture supernatant.

【 I – 2 】 Features

- Directly quantitate exosomes in human blood samples or cell culture supernatant.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

- No special equipment is required. Standard microplate reader capable of reading at 450nm will do the job.
- Stabilized AZ-ACU (Canine urothelial carcinoma cells) derived exosomes are used as standard reagents.
- Normalization with Exosome Standard enable to relative quantitate each samples.
- Capture exosomes with solid phase anti-dog CD9 antibody, then detect using HRP conjugated anti-dog CD9 antibody.

【 I – 3 】 Kit Principle

This ELISA kit uses two-step sandwich ELISA principle. The ELISA plate provided in this kit has been pre-coated with an anti-dog CD9 antibody.

First, samples were added onto the plate to capture exosomes by the anti-dog CD9 antibody. Next, HRP conjugated anti-dog CD9 antibody will be added to react exosome surface antigen, dog CD9. Finally, substrate will be added, then measure the coloring by the plate reader to quantitate sample exosomes.

【 I – 4 】 Kit Component

Storage temperature : 2 ~ 8 °C

	Reagent	Volume	Quantity
1	Anti-dog CD9 Antibody Immobilized Plate	96well (8well x 12 strips)	1 plate
2	Exosome Standard	Dried product	4tubes*
3	Assay Buffer	25mL	1vial
4	Washing Buffer (10X)	25mL	1vial
5	HRP Conjugated Anti-dog CD9 Antibody (500X)	20μL	1tube
6	Substrate Solution	12mL	1vial
7	Stop Solution (2N H ₂ SO ₄)	6mL	1vial
8	Plate Seals		2sheets

* Sufficient to create 4 standard curves with n=2.

Required Materials Not Included in the Kit

- Micropipettes (10 ~ 1000 μL)
- Multichannel micropipette

- Multichannel micropipette Reservoir
- Plate shaker
- Microplate reader (enable to measure at wavelength 450nm)
- Plate washer

【Ⅱ】 Preparation of Reagents and Samples

【Ⅱ – 1】 Preparation of Washing Buffer

- Dilute Washing Buffer (10×) to 10 folds with purified water.
e.g. For 1 plate, add 225mL of purified water to 25mL of Washing Buffer (10 x) and mix well.

【Ⅱ – 2】 Preparation of Exosome Standard solution

	Concentration (ng/mL)	Exosome Standard	Assay Buffer	Dilution factor
A	200	1vial	500μL	
B	100	250μL of A	250μL	2
C	50	250μL of B	250μL	2
D	25	250μL of C	250μL	2
E	12.5	250μL of D	250μL	2
F	6.25	250μL of E	250μL	2
G	3.13	250μL of F	250μL	2

- To prepare Solution A, add 500 μL of Assay Buffer into 1 vial of Exosome Standard, and then mix well. To prepare Solution B, add 250μL of Assay Buffer into 250μL of Solution A, and then mix well (2 times dilution). Similarly, 2 times dilution series for Solution D through H should be prepared.
- Use 200μL for measurement, using 2 wells for each solution (n=2).
- Diluted Exosome Standard Solution(3.13~200 ng/mL) should be freshly prepared at each time before use.

【Ⅱ-3】 Preparation of antibody solution

- Dilute HRP conjugated anti-dog CD9 antibody (500x) to 500 folds using Assay Buffer.
e.g. For 1 plate, add 20μL of antibody (500x) into 10mL of Assay Buffer. Mix by inverting the tube.
- * Diluted antibody solution should be freshly prepared at each time before use.

【Ⅱ-4】 Preparation of Samples (For Blood samples)

Serum or plasma is measured as a sample diluted 40-fold with Assay Buffer.

Samples generating absorbance values greater than that of the highest standard should be further diluted using Assay Buffer and reanalyzed.

【Ⅱ-5】 Preparation of Samples (For cell culture medium supernatant)

The culture medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) can be directly used to quantitate exosomes. Grow cells until it reach to the confluent state. Collect the medium supernatant, centrifuge at 2000 xg for 10min, and then used as a sample. If necessary, dilute with Assay Buffer.

【Ⅱ-6】 Sample Storage

Samples should be stored at 2~8℃ after preparation until measurement.

【Ⅲ】 Sample measurement procedure

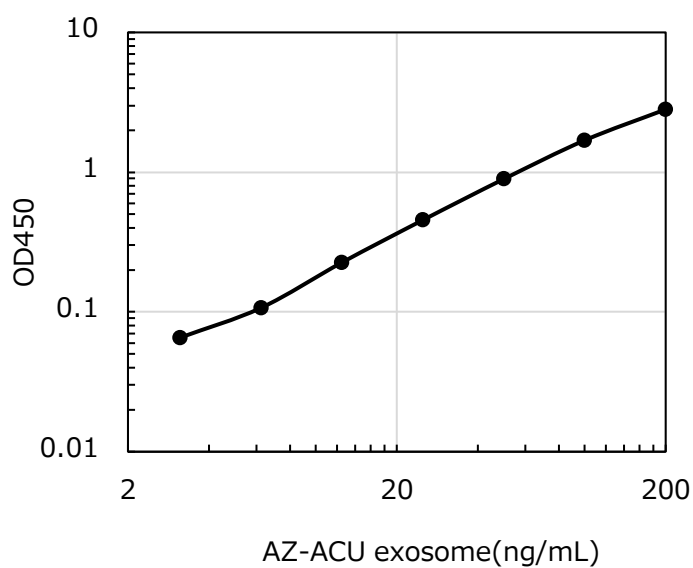
1. Bring anti-dog CD9 antibody solid phased plate and the reagents to the room temperature.
2. Prepare dog CD9 Standard Beads solution by serial dilution. (from step 【Ⅱ-2】)
3. Add 100μL each of serial diluted Exosome Standard solution (3.13~200 ng/mL) or Sample solution into the well.
4. Seal the microplate with Plate Seals, place into plate shaker, and then shake it at 800 rpm for 30 sec.
5. Incubate at room temperature for 2 hours on a plat shaker set to 800 rpm.

6. Discard all the reaction solution, and then rinse each well with 300 μ L of Washing Buffer (from step 【II-1】). Repeat this step for 3 times.
7. Add 100 μ L each of diluted HRP conjugated anti-dog CD9 antibody (from step 【II-3】) to the well.
8. Seal the plate, and then shake it in the plate shaker at 800 rpm for 30 sec.
9. Incubate at room temperature for 2 hours on a plat shaker set to 800 rpm.
10. Discard the reaction solution, and then rinse each well with 300 μ L of Washing Buffer(from step 【II-1】). Repeat this step for 3 times.
11. Add 100 μ L of Substrate Solution into each well, and then incubate at room temperature protected from light for 20min for static reaction.
12. Visually confirm the coloring, and then add 50 μ L each of Stop Solution.
13. Place into the Plate-reader, and read the absorbance of each well on a spectrophotometer at the wavelength of 450nm.
14. Create a standard curve by plotting the average blank control subtracted absorbance value for each Exosome Standard concentration (y axis) against the Exosome Standard concentration (x axis).
15. Calculate the concentration by comparing the absorbance obtained from the sample solution to the standard curve. Determine the dog CD9 exosome concentration (Unit/mL) in the sample solution as the Exosome Standard (ng/mL) equivalent. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, to obtain the concentration of dog CD9 exosome in the sample.

【IV】 Measurement example

【IV- 1】 Standard curve

As an example, the graph of absorbance (OD450) against Exosome Standard concentration is drawn as shown in Figure 1. However, draw a new standard curve for each assay to calculate the concentration in the sample.



(Plotted is the value obtained by subtracting the blank absorbance from the absorbance of each standard protein concentration)

Exosome Standard (ng/mL)	Absorbance (450nm)		Average	Calculated concentration (U/mL)
	1	2		
0	0.115	0.103	0.109	
3.13	0.179	0.170	0.175	
6.25	0.213	0.219	0.216	
12.5	0.331	0.339	0.335	
25	0.546	0.581	0.564	
50	1.013	0.992	1.003	
100	1.767	1.834	1.801	
200	2.870	2.976	2.923	
Serum	0.302	0.315	0.309	11.5

Fig.1 Standard curve and measured values

【Reference】

- 1) J. Skog, T. Wurdinger, S. van Rijn, D. H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W. T. Jr. Curry, B. S. Carter, A. M. Krichevsky and X. O. Breakefield: *Nat Cell Biol.*, 10, 1470 (2008).
- 2) T. Pisitkun, R. F. Shen and M. A. Knepper: *Proc Natl Acad Sci USA.*, 101, 13368 (2004).
- 3) S. Runz, S. Keller, C. Rupp, A. Stoeck, Y. Issa, D. Koensgen, A. Mustea, J. Sehouli, G. Kristiansen and P. Altevogt: *Gynecol Oncol.*, 107, 563 (2007).
- 4) S. Keller, A. K. Konig, F. Marme, S. Runz, S. Wolterink, D. Koensgen, A. Mustea, J. Sehouli and P. Altevogt: *Cancer Lett.*, 278, 73 (2009).
- 5) C. Lasser, V. Seyed AlikhS. Gabrielsson, J. Lotvall and H. Valadi: *J Transl Med.*, 9, 9 (2011).
- 6) Y. Naito, Y. Yoshioka, Y. Yamamoto and T. Ochiya: *Cell Mol Life Sci.*, 74, 697 (2017).
- 7) E. J. Fish, K. J. Irizarry, P. DeInnocentes, et al.: *BMC Cancer.*, 18, 832 (2018).
- 8) M. A. Rojas, B. B. Rentzsch, J. Plendl, et. al.: *BMC Vet Res.*, 14, 179 (2018).
- 9) V. Filipe, A. Hawe and W. Jiskoot: *Pharm Res.*, **27**, 796 (2010).