

CD9/CD9 Exosome ELISA Kit, Human

ヒト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ニンファミリーが挙げられます。CD9 や CD63 はそのメンバー分子で、エクソソームの表面マークターでもあります⁷。

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⁸、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いませんでした。

本キットは、エクソソーム・マーカーである CD9 に対する高性能抗体を用いたサンドイッチ ELISA により、表面に 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。

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。

- ・標準試薬として保存安定性に欠けるエクソソームそのものを使用せず、CD9 を固定した粒子径 200nm のビーズ（CD9 スタンダードビーズ）を利用してすることで安定性と再現性を確保できます。
- ・エクソソーム構造を模した CD9 スタンダードビーズ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 CD9 抗体でエクソソームを捕捉し、HRP 標識した CD9 抗体で検出します。

【I - 3】キットの原理

プレートには抗ヒト CD9 抗体が固相されていて、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 CD9 に対して HRP 標識した抗ヒト 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】構成品

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 CD9 抗体 固相化プレート	96well (8well x 12 strips)	1 枚	
2	CD9 スタンダード ビーズ	200μL	1 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 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）

				<ul style="list-style-type: none"> ・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）

- ・マイクロピッパー(10~1000μL)
- ・マルチチャンネルピッパー
- ・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】CD9 スタンダードの希釈調製（プレート 1 枚あたり 2 ウエル分ずつ調製）

	CD9 ス坦ダード 濃度(ng/mL)	CD9 ス坦ダード ビーズ	アッセイ バッファー	希釈率
A	180			
B	18	50μL of A	450μL	10
C	9	250μL of B	250μL	2
D	4.5	250μL of C	250μL	2
E	2.25	250μL of D	250μL	2

F	1.125	250µL of E	250µL	2
G	0.563	250µL of F	250µL	2
H	0.281	250µL of G	250µL	2

キットに入っている CD9 スタンダードビーズ（上表の A : 使用前にボルテックスミキサーで 30 秒間混和して下さい。）50µL にアッセイバッファー 450µL を加え（10 倍希釈）、よく混合した溶液を B とします。この B 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 C 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 CD9 スタンダードビーズ(0.281~18 ng/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 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 CD9 抗体(500 倍濃縮)を 20µL を加え、転倒混和します。希釈調製した HRP 標識抗 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（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-5】サンプル調製（血液サンプル）

血清サンプルに含まれるエクソソームを直接定量する場合には、アッセイバッファーを用いて 4 倍以上に希釈してください。（血清量は 25µL まで、総反応液量は 100µL となるように調製してください。）

【II-6】サンプルの保存

サンプル調製後測定までは 2~8°C で保存して下さい。

【III】測定方法

1. 抗 CD9 抗体固相化プレートと試薬を室温に戻します。
2. CD9 スタンダードビーズを希釈調製します（【II-2】）。
3. 2 で希釈調製した CD9 スタンダードビーズ(0.281~18 ng/mL)もしくはサンプル溶液を 1 ウエルあたり 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搅拌(800rpm, 30 秒)します。
5. 室温で 2 時間静置反応します。
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（【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 CD9 抗体（【II-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搅拌します。
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。
11. 基質液を各ウェルに 100 μ L 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 50 μ L 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 CD9 スタンダード濃度、縦軸に吸光度を取り、標準曲線を描きます（図 1）。

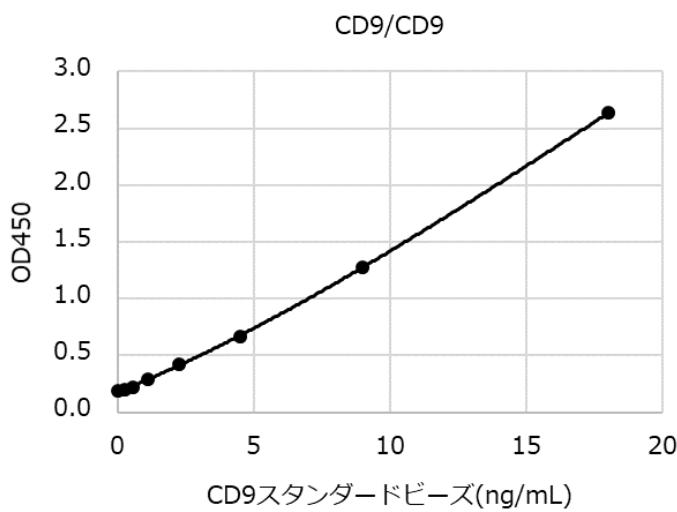


図 1 CD9 スタンダードによる標準曲線

【IV】実施例

【IV-1】サンプルの測定例

大腸がん細胞株 HCT116 の培養上清から超遠心法により精製したエクソソームを 0.781, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500ng/mL ずつウェルに 100 μ L 加え測定しました。

エクソソーム濃度(ng/mL)と吸光度(OD450)をグラフに表すと図2のようになります。

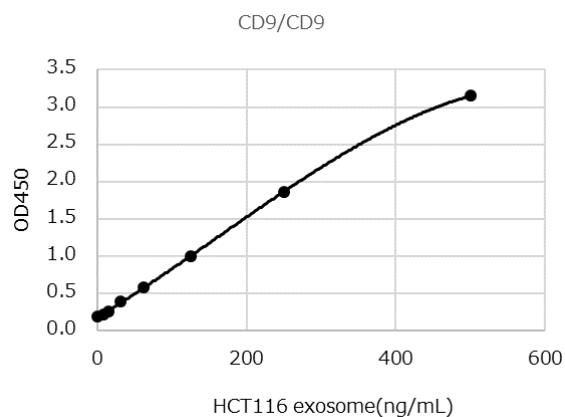


図2 HCT116 由来エクソソーム

【IV-2】測定値の標準化

CD9 スタンダードの測定結果から得られたグラフを検量線とし、例えば 10ng/mL を 1 U/mL とした場合、その OD450 測定値は約 1.4 になっています（図 3(a)）。サンプルである HCT116 由来エクソソームの OD450 測定値が 1.4 に相当するのは図 3(b)よりエクソソーム約 200ng/mL のタンパク質換算量に相当します。すなわち、HCT116 細胞由来エクソソーム約 200ng/mL を 1 U/mL の CD9 陽性エクソソームとみなすことができます。

このようにして、異なるサンプル間、あるいは異なる実験間のエクソソーム測定値をすべてユニットで示すことにより標準化して測定値を補正することができ、検体中のエクソソーム量を直接比較する事が可能となります。

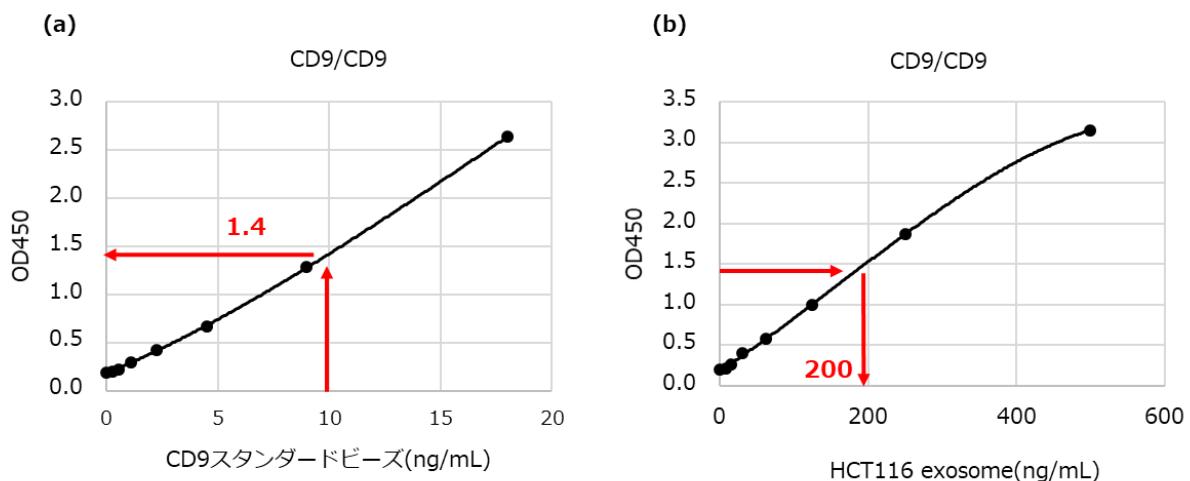


図3 測定値の標準化

【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) A. Zoraida and M. Yáñez-Mó: *Front Immunol.*, **5**, 442 (2014).
- 8) V. Filipe, A. Hawe and W. Jiskoot: *Pharm Res.*, **27**, 796 (2010).



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

本製品はコスモ・バイオ株式会社よりライセンスを受けて販売しております。

CD9/CD9 Exosome ELISA Kit, Human

【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 communication ⁶⁾. One of the exosomes' structural characteristics is the tetraspanin family which is located on their surface. CD9 and CD63 are member molecules of this family, and known to be exosome surface markers ⁷⁾.

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 particles ⁸⁾. 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-CD9 antibodies. This product detects exosome markers, 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.
- No special equipment is required. Standard microplate reader capable of reading at 450nm will do the job.
- Utilize CD9 immobilized beads of 200 nm diameter(CD9 Standard Beads), instead of unstable/hard to store exosome itself, to implement stability and reproducibility.
- Normalization with CD9 standard beads similar to exosomal structures (CD9 Standard Beads) enable to relative quantitate each samples.
- Capture exosomes with solid phase anti-CD9 antibody, then detect using HRP conjugated anti-CD9 antibody.

【I – 3】 Kit Principle

An anti-CD9 antibody was immobilized and placed on the plate. First, samples were added onto the plate to capture exosomes by the anti-CD9 antibody. Next, HRP conjugated anti-CD9 antibody will be added to react exosome surface antigen, 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-CD9 Antibody Immobilized Plate	96well (8well x 12 strips)	1 plate
2	CD9 Standard Beads	200µL	1tube*
3	Assay Buffer	25mL	1vial
4	Washing Buffer (10X)	25mL	1vial
5	HRP Conjugated Anti-CD9 Antibody (500X)	20µL	1tube
6	Substrate Solution	12mL	1vial
7	Stop Solution (2N H ₂ SO ₄)	6mL	1vial
8	Plate Seals		2 sheets

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

Required Materials Not Included in the Kit

- Micropipettes (10 ~ 1000 μ L)
- 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 \times) to x10 with purified water.
e.g. For 1 plate, add 225 mL of purified water to 25mL of Washing Buffer (10 \times) and mix well.

【II-2】 Preparation of CD9 Standard Beads solution

	Concentration (ng/mL)	CD9 Standard Beads	Assay Buffer	Dilution factor
A	180			
B	18	50 μ L of A	450 μ L	10
C	9	250 μ L of B	250 μ L	2
D	4.5	250 μ L of C	250 μ L	2
E	2.25	250 μ L of D	250 μ L	2
F	1.125	250 μ L of E	250 μ L	2
G	0.563	250 μ L of F	250 μ L	2
H	0.281	250 μ L of G	250 μ L	2

- To prepare Solution B, add 450 μ L of Assay Buffer into 50 μ L of CD9 Standard Beads (Solution A: Vortex Standard Beads for 30 seconds before use.), and then mix well (10 times dilution). To prepare Solution C, add 250 μ L of Assay Buffer into 250 μ L of Solution B,

and then mix well (2 times dilution). Similarly, 2 times dilution series for Solution D through H should be prepared.

- Use 100 μ L for measurement, using 2 wells for each solution (n=2).
- Diluted CD9 Standard Beads Solution(0.281~18 ng/mL) should be freshly prepared at each time before use.

【II-3】 Preparation of antibody solution

- Dilute HRP conjugated anti-CD9 antibody (500x) to 500 folds using Assay Buffer.
e.g. For 1 plate, add 20 μ L 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 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-5】 Preparation of Samples (For serum)

Dilute the serum sample at least four times with Assay Buffer.

* Out of 100 μ L reaction solution, serum should not be exceeded more than 25 μ L.

【II-6】 Sample Storage

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

【III】 Sample measurement procedure

1. Bring anti-CD9 antibody solid phased plate and the reagents to the room temperature.
2. Prepare CD9 Standard Beads solution by serial dilution. (from step 【II-2】)

3. Add 100 μ L each of serial diluted CD9 Standard Beads solution (0.281 ~ 18ng/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 2hrs for static reaction.
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-CD9 antibody (from step 【II-3】) to the well.
8. Seal the plate, and then shake in the plate shaker.
9. Incubate at room temperature for 2hrs for static reaction.
10. Discard the antibody solution, and then rinse each well with 300 μ L of Washing Buffer. 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 microwell on a spectrophotometer at the wavelength of 450nm.
14. Create a standard curve for the CD9 protein by plotting the mean absorbance (y axis) against the CD9 Standard concentration (x axis) (Fig. 1).

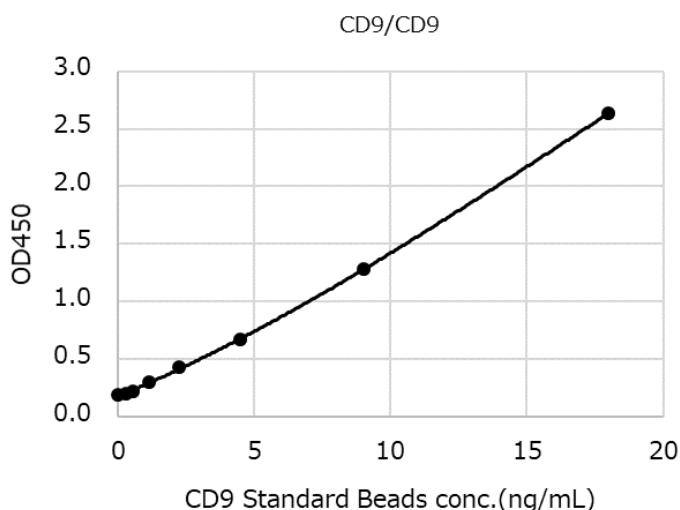


Fig.1 Example of Standard curve for CD9 Standard Beads.

【IV】 Example of Results

【IV-1】 Cell culture medium supernatant

The culture medium of colon cancer cell line, HCT116, was collected, and exosomes were purified by ultracentrifugation. The purified exosomes, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, and 500 ng/mL each, were added to the well, and measured using this kit (Fig.2).

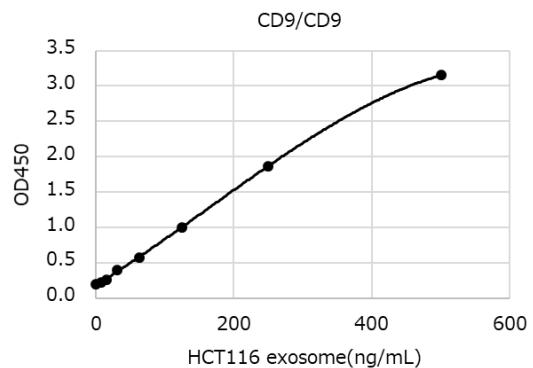


Fig.2 Exosomes from the culture supernatant of HCT116

【IV-2】 Standardization of measured values

The Standard curve was created using the measurement of CD9 Standard Beads (Fig. 3a). From here (Fig.3a), assuming 10ng/mL of CD9 Standard Beads as 1 unit/mL, the OD450 for 1unit will be 1.4. For the exosomes purified from HCT116, the protein concentration for 1 unit of OD450, which will correspond to 1.4, is about 200ng/mL (Fig.3b). Therefore, 200 ng/mL of HCT116 derived exosomes can be considered as 1unit/mL of CD9 positive exosomes.

Presenting the exosome measurement by the units, we could standardize it and/or normalize the measurements, and then will be able to compare exosome measurements directly between different samples or different experiments.

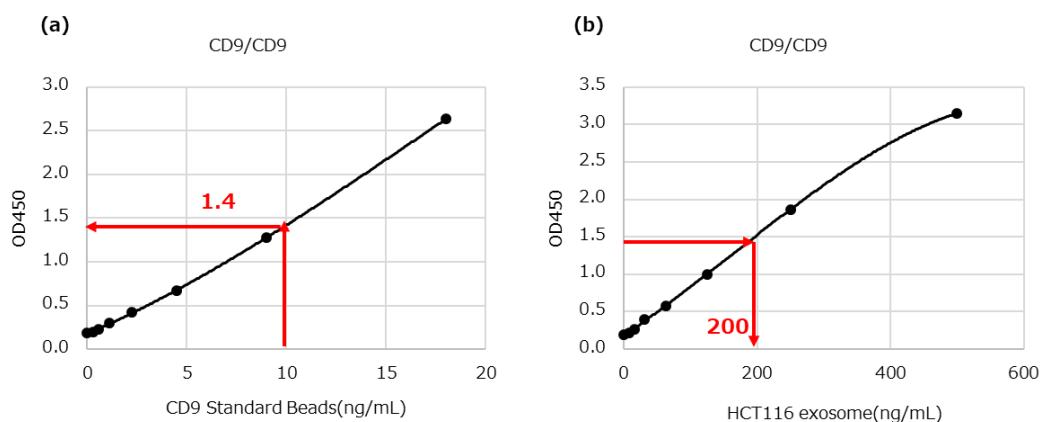


Fig.3 Standardization of measured values

【Reference】

- 9) 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).
- 10) T. Pisitkun, R. F. Shen and M. A. Knepper: *Proc Natl Acad Sci USA.*, **101**, 13368 (2004).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) C. Lasser, V. Seyed AlikhS. Gabrielsson, J. Lotvall and H. Valadi: *J Transl Med.*, **9**, 9 (2011).
- 14) Y. Naito, Y. Yoshioka, Y. Yamamoto and T. Ochiya: *Cell Mol Life Sci.*, **74**, 697 (2017).
- 15) A. Zoraida and M. Yáñez-Mó: *Front Immunol.*, **5**, 442 (2014).
- 16) V. Filipe, A. Hawe and W. Jiskoot: *Pharm Res.*, **27**, 796 (2010).



COSMO BIO CO., LTD.
Inspiration for Life Science

Licensed by Cosmo Bio Co., LTD.