

HER2/CD9 Exosome ELISA Kit, Human

ヒト HER2 陽性エクソソーム(CD9)ELISA キット

【I】キットについて

【I-1】背景と測定原理

HER2（ヒト上皮細胞増殖因子受容体2：human epidermal growth factor receptor type2）は、さまざまな固形腫瘍で頻繁に過剰発現しています。HER2はErbBファミリーの他の3つの受容体の何れともヘテロ二量体を形成します。受容体のヘテロ二量体化は、ヘテロ二量体の細胞質ドメイン内のチロシン残基の自己リン酸化をもたらし、細胞増殖と発癌につながるシグナル伝達経路を開始します。¹⁾

HER2の過剰発現および/または遺伝子増幅を抱える乳がんに対しては、分子標的治療が確立しており、そのHER2タンパクの過剰発現を調べるために免疫組織化学染色法（IHC法）があります。一般的にIHC検査は、侵襲性が高く被験者の負担も大きいことから、その負担を軽減できるエクソソームを利用したリキッドバイオプシの研究も進んでいます。

また、エクソソームはさまざまな疾患と深く関わっています。特に、HER2陽性乳がん細胞から分泌されるHER2陽性エクソソームは、抗体医薬の効果を低下させたり、周囲のがん細胞の転移を促進したりする問題のある病原因子でもあります。²⁾

これまでHER2を高発現しているがん細胞由来のエクソソームは、迅速で簡便に直接測定すること出来ませんでした。

本製品は、エクソソーム・マーカーであるCD9とHER2に対する高性能な抗体を利用し、ヒトの血液や細胞培養液において細胞が分泌するエクソソームの表面に発現するHER2分子を検出する2ステップサンドイッチELISAキットです。

【I-2】キットの特長

- ・ヒト血液サンプルや細胞培養上清などに含まれるHER2陽性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)。

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、HER2/CD9 融合タンパク質(標準タンパク質) を利用することで安定性と再現性を確保できます。
- ・HER2/CD9 融合タンパク質(標準タンパク質)を用いた標準曲線で読み取ることで各サンプルの相対定量が可能です。
- ・固相化した HER2 抗体と HRP 標識した CD9 抗体を用いて、2 ステップサンドイッチ法でヒト HER2 陽性エクソソームを検出します。

【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 HER2 抗体が予め固相されていて、サンプルを加えるとサンプル中の HER2 を発現しているエクソソームなどがトラップされます。洗浄後、トラップされた HER2 陽性エクソソームに発現している CD9 に対して HRP 標識抗 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 HER2 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	標準タンパク質 (HER2/CD9 融合タンパク質)	100μL	1 本* ¹	
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)* ²	25mL	1 本	
5	HRP 標識抗 CD9 抗体 (500 倍濃縮)* ³	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	

*¹n=2 として、検量線 2 回分

*² 洗浄バッファー(10 倍濃縮)は、冷蔵保管中に結晶が析出する場合がありますので、45℃で加温して溶解後に使用してください。

*³ 本キットを速やかに使用しない場合は、標識抗体をキットから取り出して-20℃に保管してください。

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】標準タンパク質の希釈調製 (プレート 1 枚あたり 2 ウェル分ずつ調製)

	濃度(ng/mL)	標準タンパク質	アッセイ バッファー	希釈率
A	3,000			
B	300	50 μ L of A	450 μ L	10
C	150	250 μ L of B	250 μ L	2
D	75	250 μ L of C	250 μ L	2
E	37.5	250 μ L of D	250 μ L	2
F	18.75	250 μ L of E	250 μ L	2
G	9.375	250 μ L of F	250 μ L	2
H	4.688	250 μ L of G	250 μ L	2

キットに入っている標準タンパク質 (上表の A) 50 μ L にアッセイバッファー450 μ L 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 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 C 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 x 2 = 200 μ L 使用します。

希釈調製した標準タンパク質(4.688~300ng/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)20 μ L を加え、転倒混和します。希釈調製した HRP 標識抗 CD9 抗体は、必要量を用時調製してください。

【Ⅱ-4】サンプル調製 (血清サンプル)

血清はアッセイバッファーを用いて 10 倍に希釈し、これをサンプルとして測定します。

測定範囲上限(300ng/mL)を越えたサンプルは、アッセイバッファーを用いて更に適宜希釈して測定することにより、その濃度を求めることができます。

【Ⅱ-5】 サンプル調製 (細胞培養上清)

細胞培養液を 2,000 x g で 10 分間遠心して、破片を取り除きます。その上清液をサンプルとして測定します。測定範囲上限(300ng/mL)を越えたサンプルは、アッセイバッファーを用いて適宜希釈して測定することにより、その濃度を求めることができます。

【Ⅱ-6】 サンプルの保存

未希釈のサンプルは-20℃以下で保存します。また、凍結融解を繰り返さないでください。

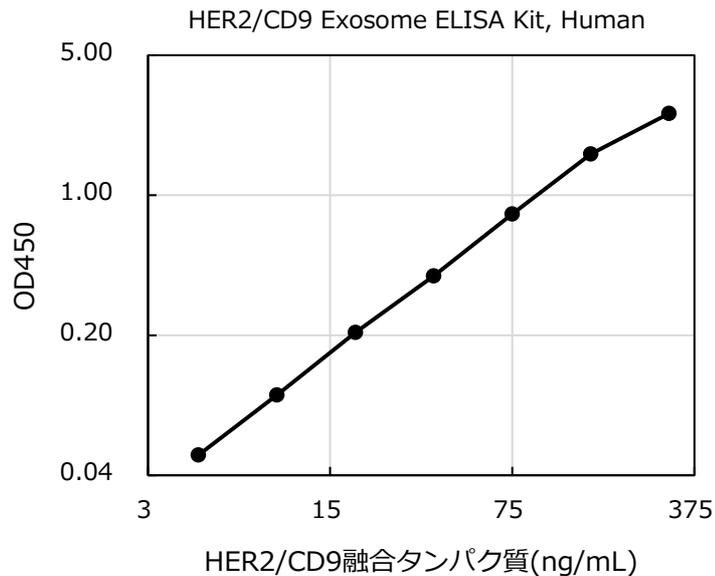
【Ⅲ】 測定方法

1. 抗 HER2 抗体固相化プレートと試薬を室温に戻します。
2. 標準タンパク質を希釈調製します (【Ⅱ-2】)。
3. 2 で希釈調製した標準タンパク質 (4.688~300ng/mL)もしくはサンプル溶液を 1 ウェルあたり 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攪拌(800rpm, 30 秒)します。
5. 室温で 1 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 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攪拌(800rpm, 30 秒)します。
9. 室温で 1 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 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。
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、標準タンパク質 (HER2/CD9 融合タンパク質(ng/mL)) 相当量としてサンプル溶液中の HER2/CD9 陽性エクソソーム濃度(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、HER2/CD9 融合タンパク質の標準タンパク質に対する吸光度(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)

標準タンパク質 (ng/mL)	吸光度(450nm)		平均吸光度
	1	2	
0	0.054	0.052	0.053
4.688	0.104	0.103	0.104
9.375	0.159	0.148	0.154
18.75	0.264	0.255	0.260
37.5	0.449	0.447	0.448
75	0.884	0.832	0.832
150	1.668	1.648	1.658
300	2.446	2.783	2.615

図1 HER2/CD9 融合タンパク質の標準タンパク質による標準曲線

【IV-2】 サンプル測定例

乳がん細胞株 SK-BR-3-Luc 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 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000ng/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。

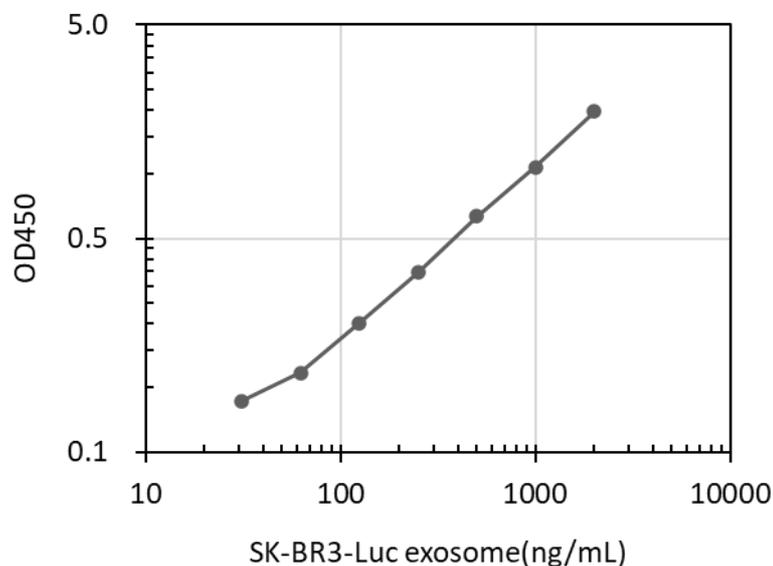


図 2 SK-BR-3-Luc 由来エクソソーム

【V】 キットの有効期限及び貯法

有効期限：箱ラベルに表示

貯法：冷蔵（2～8℃）

【参考文献】

- 1) Y. Yarden, et al.: Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2, 127 (2001)
- 2) V. Ciravolo, et al.: J Cell Physiol. 227, 658 (2012)

HER2/CD9 Exosome ELISA Kit, Human

【 I 】 About this kit

【 I – 1】 Background and Measurement Principal

HER2 are frequently overexpressed in various human malignancies. Heterodimerization of these receptors results in the autophosphorylation of tyrosine residues within the cytoplasmic domain of the heterodimer and initiates signaling pathways leading to cellular proliferation and carcinogenesis.¹⁾

Molecular targeted therapy has been established for breast cancer with HER2 overexpression and/or gene amplification, and immunohistochemical staining (IHC) is used to examine the overexpression of HER2.

As a general matter, because IHC tests are highly invasive, research on liquid biopsies using exosomes is also in progress.

Exosomes are also deeply involved in various diseases. HER2-positive exosomes secreted from HER2-positive breast cancer cells are problematic pathogenic factors that reduce the effectiveness of antibody drugs and promote the metastasis of surrounding cancer cells.²⁾

Until now, it has not been to quickly and easily directly measure exosomes derived from cancer cells that highly express HER2.

This product is a two-step sandwich ELISA kit that uses high-performance antibodies against CD9 and HER2, which are exosome markers, to detect HER2 molecules expressed on the surface of exosomes secreted by cells in human blood or cell culture medium.

【 I – 2】 Features

- Directly quantitate HER2-positive 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 HER2/CD9 fusion protein (Standard Protein), instead of unstable/hard to store

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

exosome itself, to implement stability and reproducibility.

- Normalization with a standard curve using HER2/CD9 fusion protein (Standard Protein) enable to relative quantitate each sample.
- Detect human HER2-positive exosomes by two-step sandwich method using immobilized anti-HER2 antibody and HRP conjugated anti-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-HER2 antibody.

First, samples were added onto the plate to capture HER2 by the anti-HER2 antibody. Next, HRP conjugated anti-CD9 antibody will be added to react with CD9 on the surface of HER2-positive exosomes. 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-HER2 Antibody Immobilized Plate	96well (8well x 12 strips)	1 plate
2	Standard Protein (HER2/CD9 Fusion Protein)	100μL	1tube ^{*1}
3	Assay Buffer	25mL	1vial
4	Washing Buffer (10X) ^{*2}	25mL	1vial
5	HRP Conjugated Anti-CD9 Antibody (500X) ^{*3}	20μL	1tube
6	Substrate Solution	12mL	1vial
7	Stop Solution (2N H ₂ SO ₄)	6mL	1vial
8	Plate Seals		2sheet

^{*1} Sufficient to create 2 standard curves with n=2.

^{*2} Crystals may precipitate in the Washing Buffer (10x) during refrigerated storage. Warm the buffer to dissolve it at 45°C before use.

^{*3} If the kit is not going to be used immediately, remove the labeled antibody from the kit and store it at -20°C.

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 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 Standard Protein solution

	Concentration (ng/mL)	Standard Protein	Assay Buffer	Dilution factor
A	3,000			
B	300	50 μ L of A	450 μ L	10
C	150	250 μ L of B	250 μ L	2
D	75	250 μ L of C	250 μ L	2
E	37.5	250 μ L of D	250 μ L	2
F	18.75	250 μ L of E	250 μ L	2
G	9.375	250 μ L of F	250 μ L	2
H	4.688	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 Standard Protein (Solution A), 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 200 μ L for measurement, using 2 wells for each solution (n=2).
- Diluted Standard Protein Solution(4.688~300 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 Blood samples)

Serum is measured as a sample diluted 10-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)

Centrifuge cell culture media at 2,000 x g for 10 minutes to remove debris.
Collect supernatants and assay.
Samples generating absorbance values greater than that of the highest standard should be further diluted using Assay Buffer and reanalyzed.

【 II – 6】 Sample Storage

Store un-diluted sample at -20°C or below. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

【 III】 Sample measurement procedure

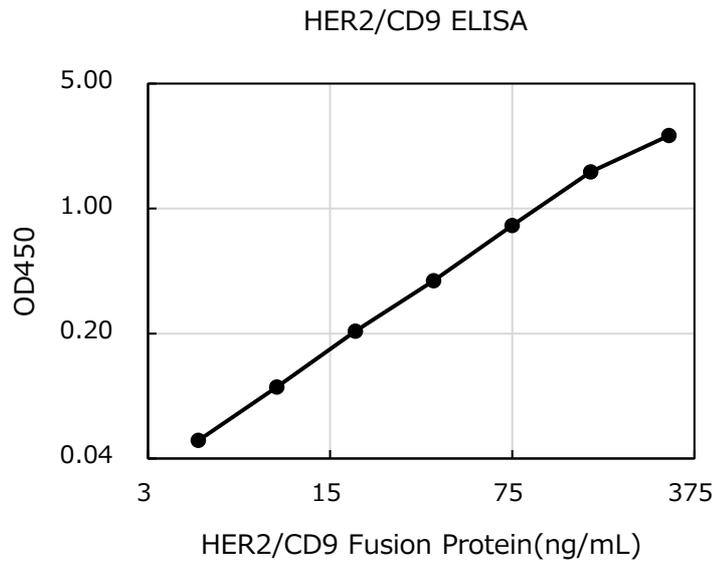
1. Bring anti-HER2 antibody solid phased plate and the reagents to the room temperature.
2. Prepare Standard Protein solution by serial dilution. (from step 【 II – 2】)
3. Add 100 μ L each of serial diluted Standard Protein solution (4.688~300 ng/mL) or Sample solution into the well.
4. Seal the microplate with Plate Seals, place into plate shaker, and then shake it at 800 rpm for 30 sec.
5. Incubate at room temperature for 1 hour 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-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 1 hour 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 Standard Protein concentration (y axis) against the Standard Protein concentration (x axis).
15. Calculate the concentration by comparing the absorbance obtained from the sample solution to the standard curve. Determine the HER2/CD9-positive exosome concentration (Unit/mL) in the sample solution as the HER2/CD9 fusion protein (ng/mL) equivalent. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, to obtain the concentration of HER2/CD9-positive exosome in the sample.

【IV】 Measurement example

【IV- 1】 Standard curve

As an example, the graph of absorbance (OD450) against 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)

Standard Protein (HER2/CD9 Fusion Protein) (ng/mL)	Absorbance (450nm)		Average
	1	2	
0	0.054	0.052	0.053
4.688	0.104	0.103	0.104
9.375	0.159	0.148	0.154
18.75	0.264	0.255	0.260
37.5	0.449	0.447	0.448
75	0.884	0.832	0.832
150	1.668	1.648	1.658
300	2.446	2.783	2.615

Fig.1 Standard curve

【IV-2】 Measurement example

The culture medium of colon cancer cell line, SK-BR3-Luc, was collected, and exosomes were purified by ultracentrifugation. The purified exosomes, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 and 2000ng/mL each, were added to the well, and measured using this kit (Fig.2).

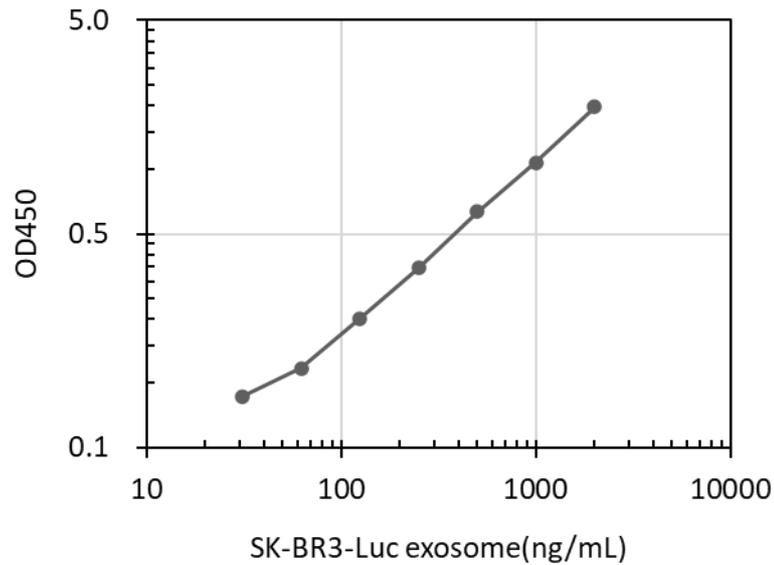


Fig.2 SK-BR-3-Luc derived exosomes

【V】 Kit expiry date and storage

Expiry date : indicated on the kit box

Storage : Refrigeration (2-8°C)

【Reference】

- 1) Y. Yarden, et al.: Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2, 127 (2001)
- 2) V. Ciravolo, et al.: J Cell Physiol. 227, 658 (2012)