

CD147/CD9 Exosome ELISA Kit, Human

ヒト CD147 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

CD147 は腫瘍細胞表面に高発現している膜貫通糖タンパク質で、線維芽細胞を刺激して多数のマトリックスメタロプロテアーゼを産生させ、腫瘍の浸潤・転移および腫瘍誘発性血管新生を促進します。¹⁾

がん細胞から血流に放出された CD147 陽性エクソソームの増加は、大腸がんなどの診断および予後のバイオマーカーとして機能する可能性が示唆されています。²⁾

本製品は、エクソソーム・マーカーである CD9 と CD147 に対する高性能な抗体を利用し、ヒトの血清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 CD147 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

- ・ ヒト血清サンプルや細胞培養上清などに含まれる CD147 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)。
- ・ 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、CD147/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。
- ・ CD147/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 CD147 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 CD147 陽性エクソソームを検出します。

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。

【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CD147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CD147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CD147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

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CD147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 (<u>CD147/CD9 融合タンパク質</u>) (20ng/mL)	200μL	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	

*¹ n=2 として、検量線 4 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。

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。

【Ⅱ-2】標準タンパク質の希釈調製（アッセイ毎に2ウェル分ずつ調製）

	濃度(pg/mL)	標準タンパク質	アッセイ バッファー	希釈率
A	20000			
B	2000	50μL of A	450μL	10
C	1000	250μL of B	250μL	2
D	500	250μL of C	250μL	2
E	250	250μL of D	250μL	2
F	125	250μL of E	250μL	2
G	62.5	250μL of F	250μL	2
H	31.25	250μL of G	250μL	2

キットに入っている標準タンパク質（上表のA）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、100μL x 2 = 200μL 使用します。

希釈調製した標準タンパク質(31.25~2000pg/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

血清はアッセイバッファーを用いて 20 倍に希釈し、これをサンプルとして測定します。

細胞培養液は、2,000 x g で 10 分間遠心して、デブリを取り除きます。その上清液をサンプルとして測定します。

測定範囲上限(2000pg/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。

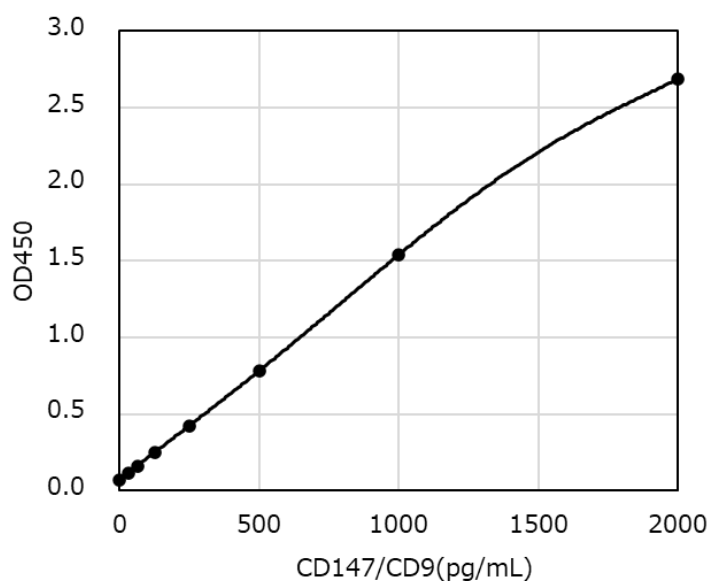
【Ⅲ】 測定方法

1. 抗 CD147 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(31.25～2000pg/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、室温で 1 時間プレートシェーカーを用いて攪拌(800rpm)します。
5. 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。
6. 希釈調製した HRP 標識抗 CD9 抗体（【Ⅱ-3】）を各ウェルに 100μL ずつ加えます。
7. プレートにシールし、室温で 1 時間プレートシェーカーを用いて攪拌(800rpm)します。
8. 抗体溶液を完全に除去し、各ウェルに 300μL の洗浄バッファーを加え、洗浄します。この操作を 3 回行って下さい。
9. 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。
10. 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。
11. 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）。
12. 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。
13. 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（CD147/CD9 融合タンパク質(pg/mL)）相当量としてサンプル溶液中の CD147/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、標準タンパク質 (pg/mL)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、標準曲線は、アッセイ毎に新たに描いてください。



標準タンパク質 (pg/mL)	吸光度(450nm)		平均吸光度
	1	2	
0	0.074	0.071	0.073
31.25	0.117	0.116	0.117
62.5	0.160	0.160	0.160
125	0.252	0.253	0.253
250	0.421	0.428	0.425
500	0.782	0.784	0.783
1000	1.491	1.589	1.540
2000	2.667	2.707	2.687

図1 標準タンパク質による標準曲線

【IV-2】 サンプルの測定例

1. 精製エクソソーム

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 (15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000ng/mL) をウェルに 100μL 加えて本キットで測定しました。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。

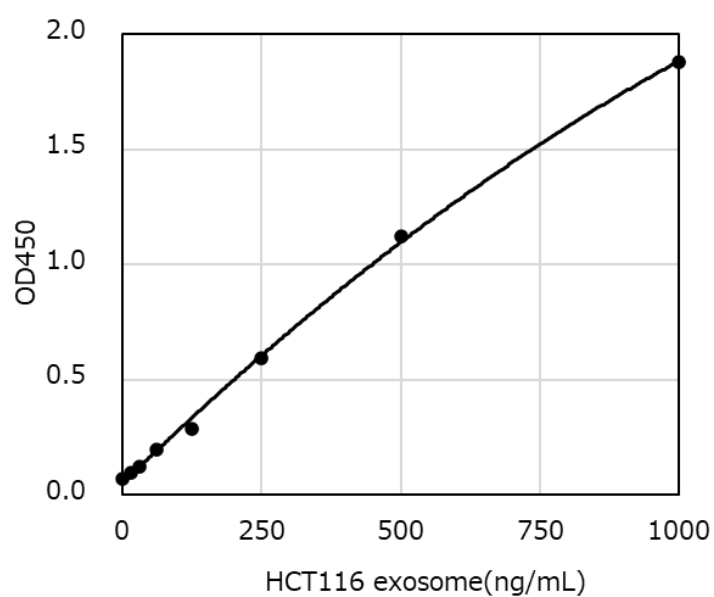


図2 HCT116 由来エクソソーム

2. HCT116 培養上清

大腸がん細胞株 HCT116 の培養上清を 2 日ごとに回収して本キットで測定した。培養日数と培養上清中の CD147/CD9 陽性エクソソーム量(吸光度:OD450)をグラフに表すと図 3 のようになります。

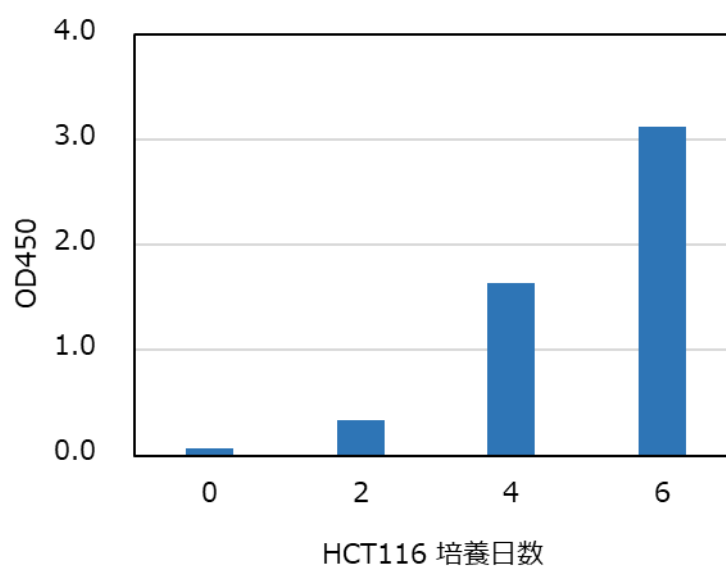


図3 HCT116 培養上清中の CD147/CD9 陽性エクソソーム量のタイムコース

【V】キットの有効期限及び貯法

有効期限：製造日から 6 か月後 (製造日はキット箱ラベルに表示)

貯法：冷蔵 (2～8℃)

【参考文献】

- 1) S. Yang, et al.: *Oncol Lett.*, **13**, 898 (2017).
- 2) Y. Yoshioka, et al.: *Nat Commun.*, **5**, 3591 (2014).

CD147/CD9 Exosome ELISA Kit, Human

【 I 】 About this kit

【 I – 1】 Background and Measurement Principal

Cluster of differentiation (CD) 147 is a transmembrane glycoprotein that is highly expressed at the tumor cell surface, which stimulates fibroblasts to produce a large number of matrix metalloproteinases and promotes tumor invasion and metastasis and tumor-induced angiogenesis.¹⁾

It has been suggested that an increase in CD147-positive exosomes released into the bloodstream from cancer cells may be useful as a diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer and other diseases.²⁾

This product is a two-step sandwich ELISA kit that uses high-performance antibodies against CD9 and CD147, which are exosome markers, to detect CD147 molecules expressed on the surface of exosomes secreted by cells in human serum or cell culture medium.

【 I – 2】 Features

- Directly quantitate CD147-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 CD147/CD9 fusion protein (Standard Protein), instead of unstable/hard to store exosome itself, to implement stability and reproducibility.
- Normalization with a standard curve using CD147/CD9 fusion protein (Standard Protein) enable to relative quantitate each sample.
- Detect human CD147-positive exosomes by two-step sandwich method using immobilized anti-CD147 antibody and HRP conjugated anti-CD9 antibody.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

【 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-CD147 antibody.

First, samples were added onto the plate to capture CD147 by the anti-CD147 antibody. Next, HRP conjugated anti-CD9 antibody will be added to react with CD9 on the surface of CD147-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 CD147 Antibody Immobilized Plate	96well (8well x 12 strips)	1 plate
2	Standard Protein (CD147/CD9 Fusion Protein) (20ng/mL)	200μL	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		2sheets

*¹ Sufficient to create 4 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 μL)
- Multichannel micropipette
- Multichannel micropipette Reservoir

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

- 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 225 mL of purified water to 25mL of Washing Buffer (10 x) and mix well.

【Ⅱ – 2】 Preparation of Standard Protein solution

	Concentration (pg/mL)	Standard Protein	Assay Buffer	Dilution factor
A	20000			
B	2000	50μL of A	450μL	10
C	1000	250μL of B	250μL	2
D	500	250μL of C	250μL	2
E	250	250μL of D	250μL	2
F	125	250μL of E	250μL	2
G	62.5	250μL of F	250μL	2
H	31.25	250μL of G	250μL	2

- To prepare Solution B, add 450μL of Assay Buffer into 50μL of Human Standard Protein (Solution A), and then mix well (10 times dilution). To prepare Solution C, add 250μL of Assay Buffer into 250μL of Solution B, and then mix well (2 times dilution). Similarly, 2 times dilution series for Solution D through H should be prepared.
- Use 100μL for measurement, using 2 wells for each solution (n=2).
- Diluted Human Standard Protein Solution(31.25~2000pg/mL) should be freshly prepared at each time before use.

【II-3】 Preparation of antibody solution

- Dilute HRP conjugated anti-Human 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

Serum is measured as a sample diluted 20-fold with Assay Buffer.

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-5】 Sample Storage

After sample preparation, store at 2-8°C until measurement.

【III】 Sample measurement procedure

1. Bring anti CD147 antibody solid phased plate and the reagents to the room temperature.
2. Prepare Human Standard Protein solution by serial dilution. (from step 【II-2】)
3. Add 100 μ L each of serial diluted Standard Protein solution (31.25~2000pg/mL) or Sample solution into the well.
4. Seal the microplate with Plate Seals.
5. Incubate at room temperature for 1 hour on a plate 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.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

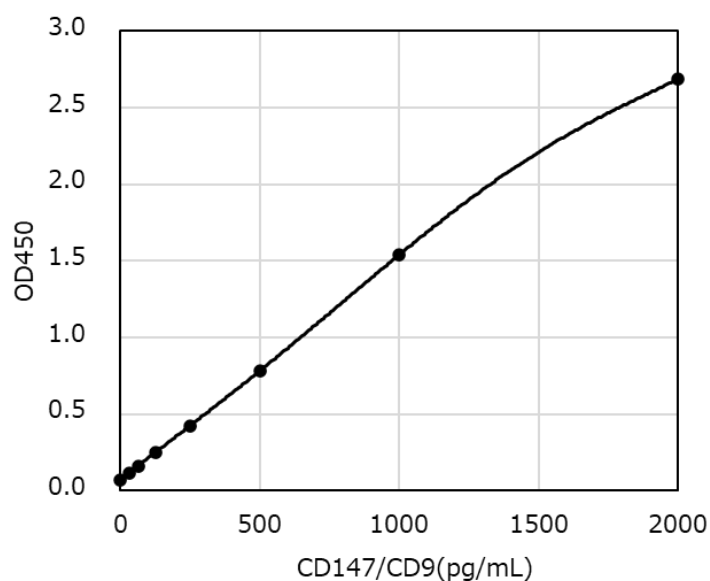
8. Seal the microplate with Plate Seals.
9. Incubate at room temperature for 1 hour on a plate shaker set to 800 rpm.
10. Discard the reaction solution, and then rinse each well with 300 μ L of Washing Buffer(from step 【II-1】). Repeat this step for 3 times.
11. Add 100 μ L of Substrate Solution into 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 absorbance value (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 CD147/CD9-positive exosome concentration (Unit/mL) in the sample solution as the CD147/CD9 fusion protein (pg/mL) equivalent. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, to obtain the concentration of CD147/CD9-positive exosome in the sample.

【IV】 Measurement example

【IV- 1】 Standard curve

As an example, the graph of absorbance (OD450) against Human Standard Protein concentration is drawn as shown in Figure 1.

However, draw a new standard curve for each assay to calculate the concentration in the sample.



Standard Protein (CD147/CD9 Fusion Protein) (pg/mL)	Absorbance (450nm)		mean
	1	2	
0	0.074	0.071	0.073
31.25	0.117	0.116	0.117
62.5	0.160	0.160	0.160
125	0.252	0.253	0.253
250	0.421	0.428	0.425
500	0.782	0.784	0.783
1000	1.491	1.589	1.540
2000	2.667	2.707	2.687

Fig.1 Standard curve and measured values

【IV-2】 Example of sample measurement

1. Purified exosomes

Exosomes (15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000ng/mL) purified by ultracentrifugation from the culture supernatant of HCT116 were measured using this kit. Figure 2 shows the exosome concentration (ng/mL) and absorbance (OD450) graphically.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

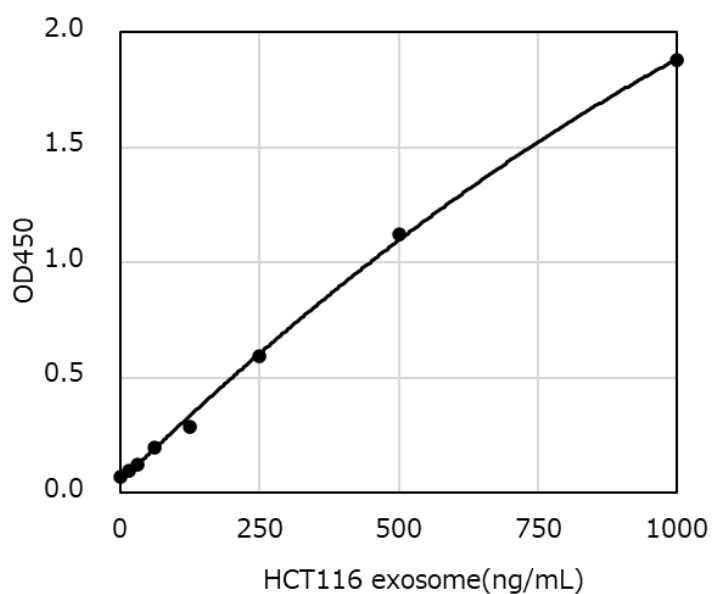


Fig.2 Measurement of exosomes

2. Cell culture supernatant

Culture supernatant of colon cancer cell line HCT116 was collected every two days and measured with this kit. Figure 3 shows the graph of the number of days of culture and the amount of CD147/CD9 positive exosomes (absorbance: OD450) in the culture supernatant.

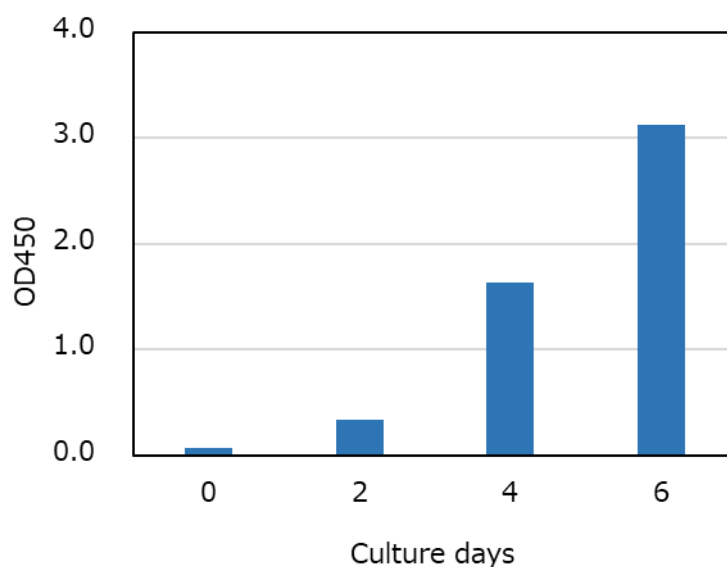


Fig.3 Time course of CD147/CD9 positive exosomes in HCT116 culture supernatant

【V】 Kit expiry date and storage

Expiry date : 6 months after the manufacturing date.

(The manufacturing date is indicated on the kit box label)

Storage : Refrigeration (2-8°C)

【Reference】

- 1) S. Yang, et al.: *Oncol Lett.*, **13**, 898 (2017).
- 2) Y. Yoshioka, et al.: *Nat Commun.*, **5**, 3591 (2014).