

CD90/CD63 Exosome ELISA Kit, Human

ヒト MSC 由来エクソソーム定量 CD90/CD63 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ペニンファミリーが挙げられます。CD9、CD63 及び CD81 はそのメンバー分子で、エクソソームの表面マーカーでもあります⁷。

ヒト間葉系幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cells, hMSC) は、組織再生活性と免疫調節活性の両方を備えた多能性細胞であり、細胞治療の魅力的なツールとなっています。ここ数年、hMSC の有益な効果はパラクリン効果によるものであり、少なくとも部分的には細胞外小胞 (エクソソームなど) によって媒介される可能性があることが示されています^{8,9}。

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¹⁰、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、hMSC でもっとも発現量が多いとされているテトラスペニンである CD63 及び MSC 由来エクソソーム・マーカーとして提案されている CD90¹¹ に対するそれぞれの高性能抗体を利用し、ヒト MSC が分泌する CD90 陽性かつ CD63 陽性エクソソームを検出する 2 ステップサンドイッチ ELISA キットです。

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-2】キットの特長

- ・ヒトの細胞培養上清などに含まれる CD90 陽性 CD63 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、CD90/CD63 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。
- ・CD90/CD63 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 CD90 抗体と HRP 標識した CD63 抗体を用いて、2 ステップサンドイッチ法で CD90 陽性 CD63 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 CD90 抗体が予め固相されていて、検体を加えると検体中の CD90 陽性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に発現している CD63 に対して HRP 標識した抗 CD63 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 CD90 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 (CD90/CD63 融合タンパク質) | 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 CD63 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】 洗浄バッファの調製

洗浄バッファ(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(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(pg/mL) | 標準タンパク質 | アッセイ バッファー | 希釈率 |
|---|-----------|------------------|---------------|-----|
| A | 8,000 | | | |
| B | 800 | 50 μ L of A | 450 μ L | 10 |
| C | 400 | 250 μ L of B | 250 μ L | 2 |
| D | 200 | 250 μ L of C | 250 μ L | 2 |
| E | 100 | 250 μ L of D | 250 μ L | 2 |
| F | 50 | 250 μ L of E | 250 μ L | 2 |
| G | 25 | 250 μ L of F | 250 μ L | 2 |
| H | 12.5 | 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(12.5~800pg/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 CD63 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 CD63 抗体(500 倍濃縮)を 20 μ L を加え、転倒混和します。希釈調製した HRP 標識抗 CD63 抗体、必要量を用時調製してください。

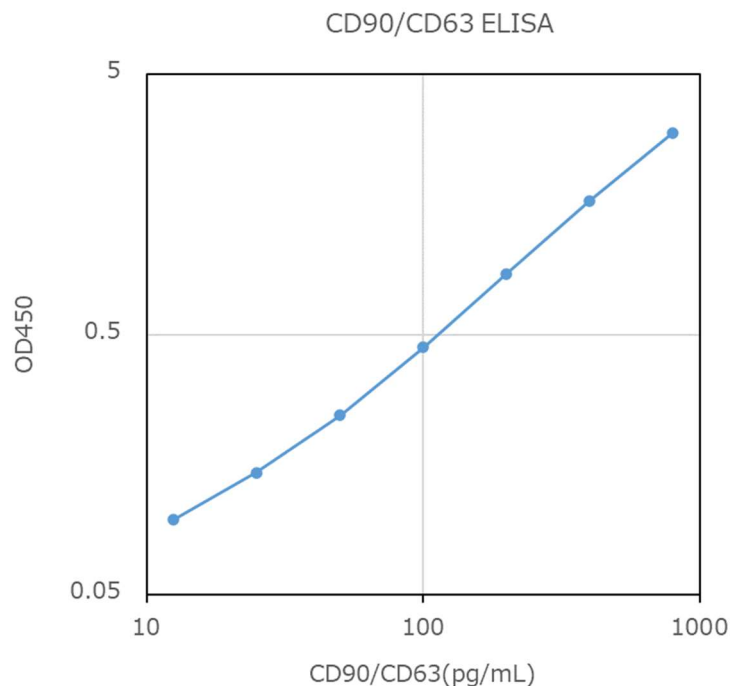
【Ⅱ-4】サンプル調製（細胞培養上清）

細胞培養上清を 2,000 \times g、10 分間遠心してデブリを除き、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。

【Ⅲ】測定方法

1. 抗 CD90 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(12.5~800pg/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CD63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(図1)。
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(CD90/CD63融合タンパク質(pg/mL))相当量としてサンプル溶液中のCD90陽性CD63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。



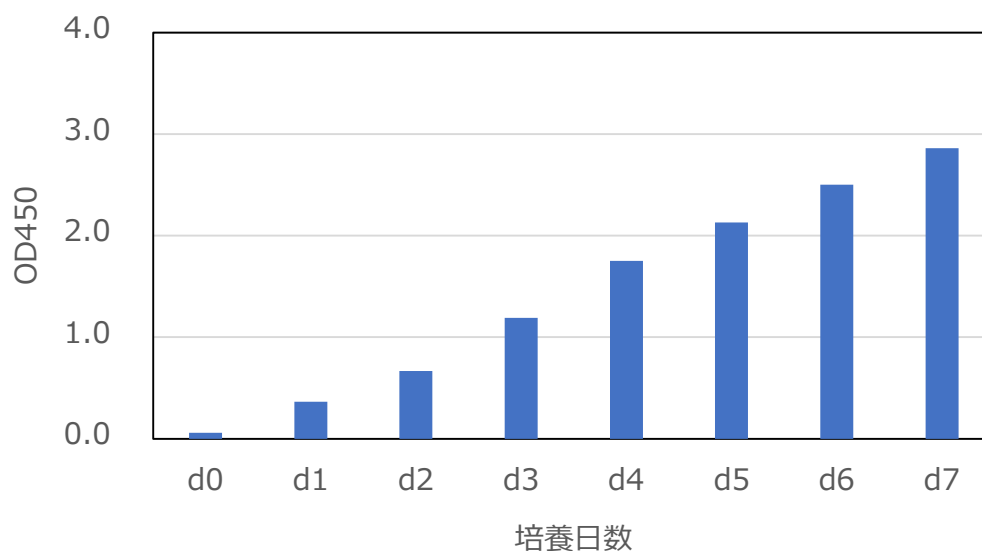
ヒト MSC 由来エクソソーム定量 CD90/CD63 ELISA キット

| 標準タンパク質 (pg/mL) | 吸光度(450nm) | | 平均吸光度 |
|--------------------|------------|-------|-------|
| | 1 | 2 | |
| 0 | 0.060 | 0.056 | 0.058 |
| 12.5 | 0.097 | 0.097 | 0.097 |
| 25 | 0.149 | 0.146 | 0.148 |
| 50 | 0.248 | 0.241 | 0.245 |
| 100 | 0.447 | 0.446 | 0.447 |
| 200 | 0.859 | 0.851 | 0.855 |
| 400 | 1.649 | 1.611 | 1.630 |
| 800 | 2.984 | 2.977 | 2.981 |

図1 標準タンパク質(CD90/CD63 融合タンパク質)による標準曲線

【IV】 サンプルの測定例

不死化 MSC 細胞である UE6E7T-3 細胞を 12 穴ディッシュで POWEREDBY10 培地 1mL 中 1.0×10^4 cells/cm² で播種し、1 日 1 穴ごとに回収した培地を 2,000xg で 5 分間遠心してデブリを除き、凍結保存したものを希釈せずそのまま本キットで測定した。



MSC 培養上清中の CD90/CD63 陽性エクソソーム量のタイムコース

【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) L. S. Meirelles, A. M. Fontes, D. T. Covas and A. I. Caplan: *Cytokine Growth Factor Rev.*, **20**, 419 (2009).
- 9) S. Rani, A. E. Ryan, M. D. Griffin and T. Ritter: *Mol Ther.*, **23**, 812 (2015).
- 10) V. Filipe, A. Hawe and W. Jiskoot: *Pharm Res.*, **27**, 796 (2010).
- 11) M. Théry et al.: *J Ext Vesicles*, **7**, 1535750 (2018).

CD90/CD63 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⁾.

Human mesenchymal stromal cells (hMSC) are multipotent cells with both regenerative and immunomodulatory activities making them an attractive tool for cellular therapy. Human mesenchymal stromal cells (hMSC) are multipotent cells with both regenerative and immunomodulatory activities making them an attractive tool for cellular therapy.^{8,9)}.

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 ¹⁰⁾. 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.

This product is a two-step sandwich ELISA kit to quantitate the exosomes which are secreted from hMSC and positive in both CD63 which is a dominant tetraspanin in hMSC and CD90¹¹⁾

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

which is proposed as a marker for hMSC-derived exosomes utilizing high-performance anti-CD90 and anti-CD63 antibodies.

【 I – 2 】 Features

- Directly quantitate both CD90- and CD63-positve exosomes in cell culture supernatant.
- No special equipment is required. Standard microplate reader capable of reading at 450nm will do the job.
- Utilize CD90/CD63 fusion protein (Standard Protein), instead of unstable/hard to store exosome itself, to implement stability and reproducibility.
- Normalization with a standard curve using CD90/CD63 fusion protein (Standard Protein) enable to relative quantitate each sample.
- Detect both CD90- and CD63-positve exosomes by two-step sandwich method using immobilized anti-CD90 antibody and HRP conjugated anti-CD63 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-CD90 antibody.

First, samples were added onto the plate to capture exosomes by the anti-CD90 antibody. Next, HRP conjugated anti-CD63 antibody will be added to react with CD63 on the surface of 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-CD90 Antibody Immobilized Plate | 96well (8well x 12 strips) | 1 plate |
| 2 | Standard Protein (CD90/CD63 Fusion Protein) | 200μL | 1tube* |
| 3 | Assay Buffer | 25mL | 1vial |
| 4 | Washing Buffer (10X) | 25mL | 1vial |
| 5 | HRP Conjugated Anti-CD63 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 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 x10 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 CD9 Standard Beads solution

| | Concentration (pg/mL) | Standard Protein (CD90/CD63 Fusion Protein) | Assay Buffer | Dilution factor |
|---|--------------------------|---|--------------|--------------------|
| A | 8000 | | | |
| B | 800 | 50µL of A | 450µL | 10 |
| C | 400 | 250µL of B | 250µL | 2 |
| D | 200 | 250µL of C | 250µL | 2 |
| E | 100 | 250µL of D | 250µL | 2 |
| F | 50 | 250µL of E | 250µL | 2 |

| | | | | |
|---|------|------------|-------|---|
| G | 25 | 250μL of F | 250μL | 2 |
| H | 12.5 | 250μL of G | 250μL | 2 |

- To prepare Solution B, add 450μL of Assay Buffer into 50μL of 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 Standard Protein Solution (12.5~800pg/mL) should be freshly prepared at each time before use.

【II-3】 Preparation of antibody solution

Dilute HRP conjugated anti-CD63 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 cell culture medium supernatant)

Centrifuge the cell culture supernatant at 2000 × g for 10 minutes to remove debris and use it as a sample. If dilution is necessary, dilute with assay buffer.

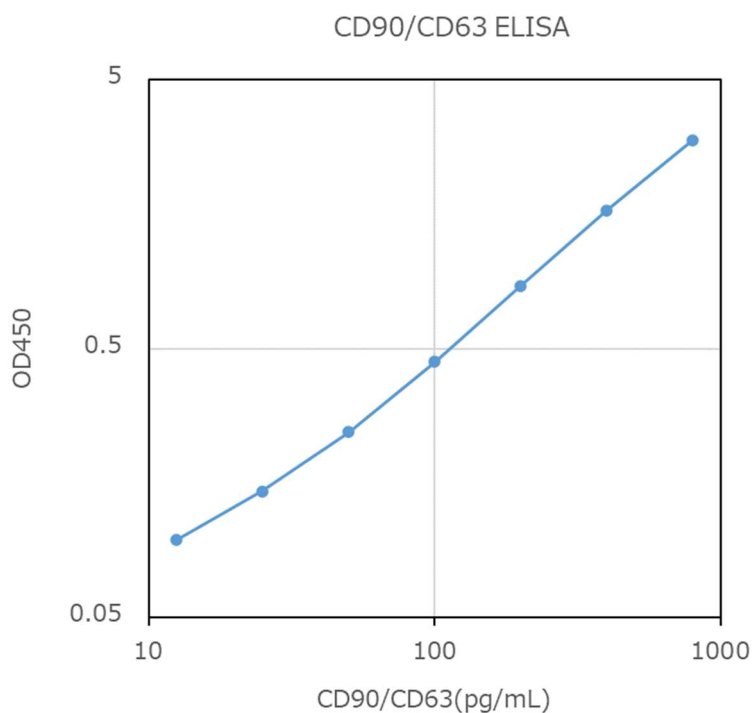
【II-5】 Sample Storage

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

【III】 Sample measurement procedure

1. Bring anti-CD90 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 100μL each of serial diluted Standard Protein solution (12.5~800pg/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-CD63 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 1 hour on a plat shaker set to 800 rpm.
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 by plotting the average blank control subtracted absorbance value for each Standard Protein concentration (y axis) against the Standard Protein concentration (x axis) (Fig. 1).
15. Calculate the concentration by comparing the absorbance obtained from the sample solution to the standard curve. Determine the CD90-positive exosome concentration (Unit/mL) in the sample solution as the CD90/CD63 fusion protein (pg/mL) equivalent. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, to obtain the concentration of both CD90- and CD63-positve exosomes in the sample.

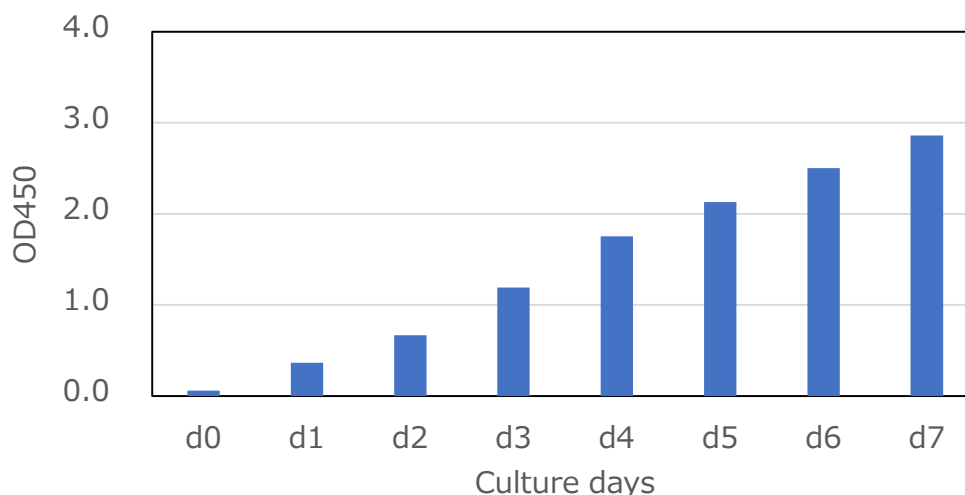


| Standard Protein (CD90/CD63 Fusion Protein) (pg/mL) | Absorbance (450nm) | | Average |
|--|-----------------------|-------|---------|
| | 1 | 2 | |
| 0 | 0.060 | 0.056 | 0.058 |
| 12.5 | 0.097 | 0.097 | 0.097 |
| 25 | 0.149 | 0.146 | 0.148 |
| 50 | 0.248 | 0.241 | 0.245 |
| 100 | 0.447 | 0.446 | 0.447 |
| 200 | 0.859 | 0.851 | 0.855 |
| 400 | 1.649 | 1.611 | 1.630 |
| 800 | 2.984 | 2.977 | 2.981 |

Fig.1 Standard curve and measured values

【IV】 Sample measurement example

UE6E7T-3 cells, immortalized MSC, were seeded in a 12 well dish (1×10^4 cells/cm²) with 1mL POWEREDBY10 medium. The supernatant in each well was collected day by day, then centrifuged at 2,000 x g for five minutes to remove debris. The frozen stocks of the supernatants were thawed and directly measured with this kit.



Time course measurement of both CD90- and CD63-positive exosomes in immortalized MSC culture supernatant

【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) A. Zoraida and M. Yáñez-Mó: *Front Immunol.*, **5**, 442 (2014).
- 8) L. S. Meirelles, A. M. Fontes, D. T. Covas and A. I. Caplan: *Cytokine Growth Factor Rev.*, **20**, 419 (2009).
- 9) S. Rani, A. E. Ryan, M. D. Griffin and T. Ritter: *Mol Ther.*, **23**, 812 (2015).
- 10) V. Filipe, A. Hawe and W. Jiskoot: *Pharm Res.*, **27**, 796 (2010).
- 11) M. Théry et al.: *J Ext Vesicles*, **7**, 1535750 (2018).