

EpCAM/CD9 Exosome ELISA Kit, Human

ヒト EpCAM 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

ヒト EpCAM（上皮細胞接着因子：epithelial cell adhesion molecule）は、細胞膜表面に存在する 314 アミノ酸からなる膜貫通型糖タンパク質です。多くのがん組織では EpCAM が過剰発現し、特に、結腸、直腸、乳房、肺、前立腺がんで EpCAM の発現亢進が観察されます¹⁾。EpCAM は、細胞間接着に関与するだけでなく、細胞増殖やがん幹細胞性など、腫瘍の進行に関連する他の重要な細胞機能にも影響を与えます²⁾。

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 30～200 nm の小胞です。また、ほとんどのタイプの癌組織からは腫瘍細胞に関する分子情報を運ぶ多数のエクソソームが放出されることが報告されています³⁾。この腫瘍細胞に由来するエクソソームが有する情報は、臨床研究における重要なツールになる可能性があります⁴⁾。

しかしながら、エクソソームを解析するには、超遠心法などでエクソソームを精製する必要があり、腫瘍細胞に由来するエクソソームを迅速で簡便に直接測定することは出来ませんでした。

本製品は、エクソソーム・マーカーである CD9 と上皮組織由来のがんの診断および予後のマーカーと言われる EpCAM に対する高性能なモノクローナル抗体を利用し、ヒトの血液や細胞培養液において細胞が分泌する EpCAM 陽性エクソソームを直接定量的に検出する 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 EpCAM 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、EpCAM /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。
- ・EpCAM /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 CD9 抗体と HRP 標識した EpCAM 抗体を用いて、2 ステップサンドイッチ法でヒト EpCAM 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 CD9 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する EpCAM に対して HRP 標識抗 EpCAM 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	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 (EpCAM/CD9 融合タンパク質)	100μL	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 EpCAM 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 2 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】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	200			
B	20	50μL of A	450μL	10
C	10	250μL of B	250μL	2
D	5	250μL of C	250μL	2
E	2.5	250μL of D	250μL	2
F	1.25	250μL of E	250μL	2
G	0.625	250μL of F	250μL	2
H	0.313	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、 $100\mu\text{L} \times 2 = 200\mu\text{L}$ 使用します。

希釈調製した標準タンパク質(0.313~20ng/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 EpCAM 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 EpCAM 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 EpCAM 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 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(20ng/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-4】 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(20ng/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。

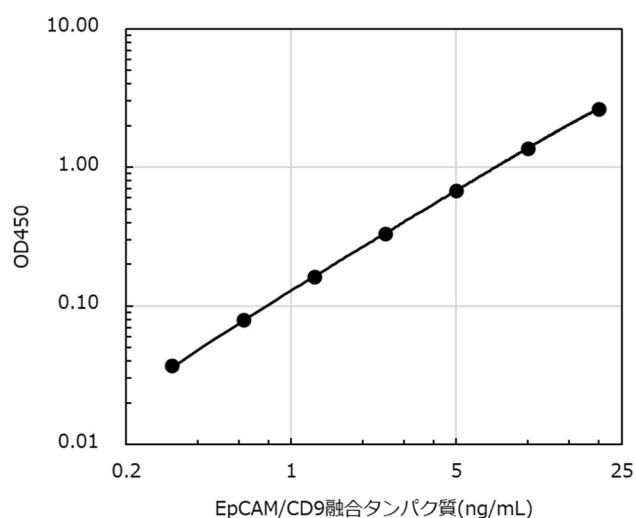
【Ⅲ】 測定方法

1. 抗 CD9 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 (0.313~20ng/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 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 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 EpCAM 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 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 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、標準タンパク質（EpCAM /CD9 融合タンパク質(ng/mL)）相当量としてサンプル溶液中の EpCAM 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、EpCAM /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	濃度計算値 (U/mL)
	1	2		
0	0.067	0.056	0.062	
0.313	0.099	0.098	0.099	
0.625	0.139	0.144	0.142	
1.25	0.222	0.224	0.223	
2.5	0.390	0.394	0.392	
5	0.745	0.746	0.746	
10	1.436	1.427	1.432	
20	2.716	2.689	2.703	7.07
培養上清液	0.979	1.085	1.032	

図 1 EpCAM /CD9 融合タンパク質の標準タンパク質による標準曲線およびサンプル測定

【参考文献】

- 1) PT. Went, A. Lugli, S. Meier, et al.: *Hum Pathol.*, **35**, 122 (2004).
- 2) K. Laura, W. Stefan, P. Klaus: *Cell Stress.*, **3**, 165(2019).
- 3) AV. Vlassov, S. Magdaleno, R. Setterquist, et al.: *Biochim Biophys Acta.*, **1820**, 940 (2012).
- 4) C. Théry, S. Amigorena, G. Raposo, et al.: *Curr Protoc Cell Biol.*, **30**, Unit 3.22 (2006).

EpCAM/CD9 Exosome ELISA Kit, Human

【 I 】 About this kit

【 I – 1 】 Background and Measurement Principal

Human EpCAM protein is a transmembrane glycoprotein of 314 aa.

In the majority of cancer tissues, EpCAM is frequently overexpressed. Especially high abundant levels of EpCAM expression can be observed in carcinomas derived from colon, rectum, breast, lung and prostate.¹⁾ Besides affecting intercellular adhesion, EpCAM influences other important cellular functions relevant to tumor progression including cell proliferation and cancer stemness.²⁾

Exosomes are membrane vesicles which are secreted from many types of cells in the body and have a diameter of about 30nm~200nm. Recent reports demonstrate that most types of cancer tissue secrete large numbers of exosomes that carry molecular information about the parental tumor cells.³⁾ The information about exosomes derived from cancer cells could be an important tool for the clinical investigation.⁴⁾

However, as the analysis of exosome requires exosome purification processes using ultracentrifugation and so on, there were no rapid and convenient methods for direct measurement of exosome until now.

This product is a two-step sandwich ELISA, which utilizes high-performance anti-EpCAM and anti-CD9 monoclonal antibodies to directly and quantitatively detect EpCAM molecules on the surface of exosomes in human blood samples and cell culture supernatants.

【 I – 2 】 Features

- Directly quantitate exosomal EpCAM 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.

For research use only, Not for diagnostic use.

Please read this manual thoroughly before use.

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

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

* Sufficient to create 2 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 Standard Protein solution

	Concentration (ng/mL)	Standard Protein	Assay Buffer	Dilution factor
A	200			
B	20	50μL of A	450μL	10
C	10	250μL of B	250μL	2
D	5	250μL of C	250μL	2
E	2.5	250μL of D	250μL	2
F	1.25	250μL of E	250μL	2
G	0.625	250μL of F	250μL	2
H	0.313	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 200μL for measurement, using 2 wells for each solution (n=2).
- Diluted Standard Protein Solution(0.313~20 ng/mL) should be freshly prepared at each time before use.

【Ⅱ – 3】 Preparation of antibody solution

- Dilute HRP conjugated anti-EpCAM 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 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

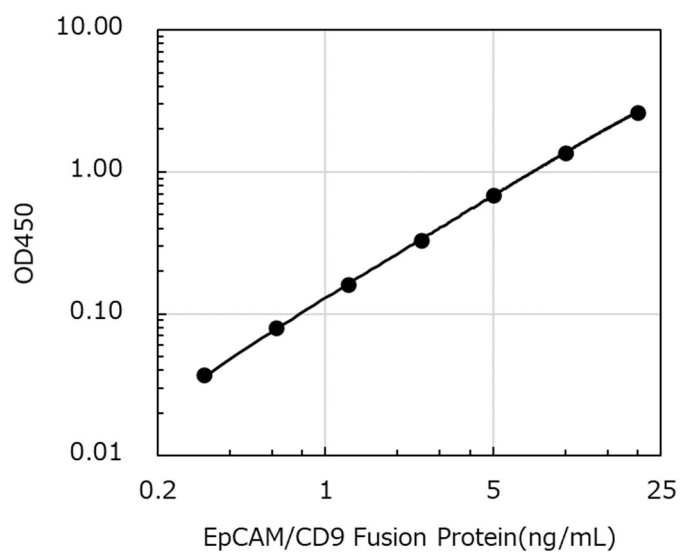
1. Bring anti-CD9 antibody solid phased plate and the reagents to the room temperature.
2. Prepare Standard Protein solution by serial dilution. (from step 【Ⅱ – 2】)
3. Add 100μL each of serial diluted Standard Protein solution (0.156 ~ 10 ng/mL) or Sample solution into the well.
4. Seal the microplate 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-EpCAM 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 EpCAM-positive exosome concentration (Unit/mL) in the sample solution as the EpCAM/CD9 fusion protein (ng/mL) equivalent. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, to obtain the concentration of EpCAM 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 (EpCAM/CD9 Fusion Protein) (ng/mL)	Absorbance (450nm)		Average	Calculated concentration (U/mL)
	1	2		
0	0.067	0.056	0.062	
0.313	0.099	0.098	0.099	
0.625	0.139	0.144	0.142	
1.25	0.222	0.224	0.223	
2.5	0.390	0.394	0.392	
5	0.745	0.746	0.746	
10	1.436	1.427	1.432	
20	2.716	2.689	2.703	
cell culture supernatants	0.979	1.085	1.032	7.07

Fig.1 Standard curve and measured values

【Reference】

- 1) PT. Went, A. Lugli, S. Meier, et al.: *Hum Pathol.*, **35**, 122 (2004).
- 2) K. Laura, W. Stefan, P. Klaus: *Cell Stress.*, **3**, 165(2019).
- 3) C. Théry, M. Ostrowski, E. Segura: *Nat Rev Immunol.*, **9**, 581 (2009).
- 4) AV. Vlassov, S. Magdaleno, R. Setterquist, et al.: *Biochim Biophys Acta.*, **1820**, 940 (2012).
- 5) C. Théry, S. Amigorena, G. Raposo, et al.: *Curr Protoc Cell Biol.*, **30**, Unit 3.22 (2006).