Exorapid-qIC[®] 細胞外小胞用イムノクロマトキット(CD63) [品番 : DNT-EXO-K02] 使用方法説明書



≻ はじめに

Exorapid-qIC[®]は迅速かつ簡易的に、サンプルに含まれる細胞外小胞を定量するためのキットです。

▶ キット内容

No.	内容物	数量
1	CD63 抗体塗布 イムノクロマト試験紙 ^{※1}	40 枚 ^{※2}
2	金ナノプレート標識抗体(CD63) [凍結乾燥品]	1 本(1400µL 相当) ^{※3}
3	標準物質(rCD63:リコンビナント CD63) [凍結乾燥品]	1 本(280ng 相当) ^{※4}
4	検体希釈液	1本(1.2mL)
5	洗浄液	1本 (10mL)
6	アッセイ用マイクロプレート(96 ウェル)	1枚
7	使用方法説明書(本書)	1 部

※1. 他種抗体の試験紙と区別をするため、吸水紙部分に鉛筆で一本線を引いております.

※2. 予備として 10%(4 本)程度多く含んでおります.

※3. 40 分析分(1200μL)+予備 200μL.

※4. 140uLの精製水に溶解することで, 濃度 2.0ng/µLの溶液を調製する.

▶ 必要なもの(キット以外)

マイクロピペット	ペーパータオル
卓上ミキサー(チューブ用)	マイクロチューブ (0.5~2.0mL 容量推奨)
ピンセット	精製水 ^{※5}
イムノクロマト用測定器もしくはスキャナー	卓上遠心機
テープ	

※5. 純水, 超純水, 蒸留水など

▶ 使用上の注意

凍結乾燥品の内容物やイムノクロマト試験紙は、室温に戻してからアルミパウチを開封して取り出してください. 内容物がキャップやチューブの内壁に付着している場合があります. 開封前に卓上遠心機によるフラッシング等で落としてからご使用ください. ▶ アウトライン





> プロトコル

<検出試験>

1 標準物質(rCD63)溶液の調製(検量線用)

rCD63[凍結乾燥品]のチューブに 140µL の精製水を注入し, 卓上ミキサーを用いて攪拌することで溶解 する(溶解後の濃度 40ng/20µL、以下 rCD63 原液).

マイクロチューブを3本用意し,表1を参考に濃度の異なるrCD63希釈液①~③を調製し,使用前まで 氷上で静置する.なお検量線のデータポイントは0(検体希釈液),5(希釈液③),10(希釈液②),20(希釈液 ①) [ng/20µL]の4点とする.

表1. rCD63 希釈溶液調製表(n=3 の場合^{**6})

略称 rCD63	rCD63濃度	希釈液の調製表(µL)				調製量	最終液量
	(ng/20uL)	rCD63原液	希釈液①	希釈液②	検体希釈液	(uL)	L) (uL)
		(40ng/20µL)	(20ng/20µL)	(10ng/20µL)		(=-)	()/
希釈液①	20.0	65	-	-	65	130	75
希釈液②	10.0	-	55	-	55	110	75
希釈液③	5.0	-	-	35	35	70	70

2 検体溶液の調製

イムノクロマト紙への展開量が1枚当たり20µLとなるように,細胞外小胞を含有する検体溶液に検体希 釈液を添加して調製する(例:検体溶液5µL+検体希釈液15µL).

検体は希釈後に氷上で1時間静置する(イムノクロマト中のサンプルの目詰まりを防ぐため).

3 金ナノプレート標識抗体溶液の調製

金ナノプレート標識抗体(凍結乾燥品)に精製水 1400µL を注入し,卓上ミキサーを用いて攪拌することで溶解する.

4 各展開溶液の注入,およびイムノクロマト試験紙への溶液展開

室温に戻した検体希釈液(Blank 溶液),「1 標準物質(rCD63)溶液の調製」で調製した各濃度の r CD63 溶液, および「2 検体溶液の調製」で調製した検体溶液を 20µL ずつ別々のウェルに注入する. 室温に戻したイムノクロマト試験紙をアルミパウチから取り出し, キムタオルに試験紙下部を触らないように並べる. 大きな剥がれがあるものは除外する.

ピンセットで上記溶液が注入されたウェルに垂直に立てて浸けることで各溶液をイムノクロマト紙に展開させる (所要時間:約10分).

5 イムノクロマト試験紙の洗浄 各溶液が全量展開されたのを確認した後、洗浄液 10µL を同じウェルに新たに注入し、イムノクロマト試験 紙を浸け直す(所要時間:約5分).

6 金ナノプレート標識抗体の展開

金ナノプレート標識抗体溶液 30µLを同じウェルに入れ, イムノクロマト試験紙を浸け直す. この段階で, テストラインとコントロールラインが青色に呈色する(所要時間:約15分).

7 イムノクロマト試験紙の洗浄
 未使用のウェルに洗浄液 50µL を注入し、イムノクロマト試験紙を洗浄液に 15 分間浸ける.

8 検体に含まれる細胞外小胞の定量 テストラインの強度を①CMS^{*7}、②ImageJ^{*8}、③イムノクロマト用測定器などで測定する. rCD63の検出結果から検量線を作成し、検体中の細胞外小胞量(CD63相当量)を算出する.

- ※7. TOPPAN 株式会社よりリリースされた、Color Management Systemの略。【導入検討中】 (リリース記事: <u>https://www.holdings.toppan.com/ja/news/2024/02/newsrelease240227_1.html</u>)
- ※8. ImageJによる解析手法は次ページを参照.

^{※6.} n=3 での試験を推奨しております。

1 試験紙の撮影

```
試料展開後の試験紙をデジタルカメラやスキャナーで撮影し,画像データを JPEG 形式で保存する.
☞台紙等に貼付してから撮影する方が撮影し易くなる.
```

- 2 ImageJ の準備
 - ① ダウンロード

パブリックドメインの画像処理ソフトウェア「Image J」を下記 URL よりダウンロードする.

URL: https://imagej.net/ij/ (2024年7月22日時点)

ダウンロードしたファイル一式から「Image」」を選択して起動する.

詳細な基本操作は下記 URL をご参照.

URL: https://imagej.net/ij/docs/guide/user-guide.pdf (2024年7月22日時点)

② セットアップ

"Analyze"タブ→"Set Measurements"を選択し, "Area"と"Mean grey value"にチェックを入れる.

d Imagel	Analyze Pluging Window Help	- • ×	🕌 Set Measurements	×
File Edit Image Process _	Analyze Plugins Window Help Measure Ctrl+M Analyze Particles Summarize Distribution Label Clear Results Set Measurements Set Scale Calibrate Histogram Ctrl+H Plot Profile Ctrl+K Surface Plot Gels Tools	801	Karea Standard deviation Min & max gray value Center of mass Bounding rectangle Shape descriptors Integrated density Skewness Area fraction Limit to threshold Invert Y coordinates Add to overlay	Mean gray value Modal gray value Centroid Perimeter Fit ellipse Feret's diameter Median Kurtosis Stack position Display label Scientific notation NaN empty cells
	図 6-(a)		Redirect to: Decimal places (0-9): 	None - 3 OK Cancel Help 6-(b)

3 試験紙画像の読み込み

"File"タブ→"Open"を選択し, 画像ファイルを読み込む.

JPEG 形式以外の画像の場合正しく解析できない場合があるため, JPEG 形式に変換してから使用する.

ImageJ		- 🗆 🗙
File Edit Image Process An	alyze Plugins Window Help	2 8 2 2 2 2
New	, A Q 🤊 🚽 CF 🔤 🖉	8 1 7 >
Open Ctrl+	ht click to switch)	
Open Next Ctrl+Shift+	D	
Open Samples	 スクリーンジョット 2022-10-11 111644.pmg (74.9) 634x597 pixels, RGB, 1.4MB 	9 – D ×
Open Recent	1 2	3
Import		
Show Folder	•	
Close Ctrl+V	v	
Close All Ctrl+Shift+V	v	
Save Ctrl+	S	
Save As	•	
Revert Ctrl+Shift+	२ 🛖 🗕	_
Page Setup	721- (T) 743	
Print Ctrl+	P	
Quit		

図 7



4 ROI Manager を開く

ツールバーの矩形 ROI(四角形の範囲指定ツール)を選択する. "Analyze"タブ→"Tools"→"ROI Manager"を開く.



5 テストライン, バックグラウンドの輝度測定

- テストラインの情報入力 画像中のテストライン範囲^{※9}を矩形で囲み、キーボードの「T」をタイプすると囲まれた部分の情報が R OI Manager に入力される。
- ② バックグラウンドの情報入力 テストラインエリアと同じ面積の矩形をドラッグ&ドロップで移動させ、試験紙の呈色していない部分を選 択し、①と同様の手順でバックグラウンドエリアの情報を ROI Manager に入力する.

解析対象のすべての試験紙に対して上記①②を繰り返す.

"Show All", "Labels"にチェックを入れて画像に選択エリアと番号を表示させ, 選択エリアや順番に間 違いがないか確認する.



※9. 検出量が少ない場合、テストライン中央部が薄くなることがございますが、品質に問題はございません.

6 検出強度算出

前項の ROI Manager に入力された情報を選択して, ROI Manager のウインドウ中の"Measure"をク リックすると, Results のウインドウが開き, 矩形で囲んだ範囲の平均輝度(Mean)が表示される. これ を全て選択, エクセルに貼付し, バックグラウンドの"Mean"からテストラインの"Mean"を減算し, 輝度(検 出強度)を算出する.



7 検体に含まれる細胞外小胞の定量

rCD63 の輝度解析結果より作成した検量線を用いて検体中の細胞外小胞量(CD63 相当量)を算出する.^{※10,※11}

※10. Blank 試験においても検出ラインが出現することがございます. 品質に問題はございません.

※11. 検量線は多項式(2次式)を推奨いたします.

▶ 問合せ先

大日本塗料株式会社

スペシャリティ事業部門 新事業開拓部

TEL: 0287-29-1636 E-mail: evs-support@star.dnt.co.jp