

Exorapid-qIC[®]

細胞外小胞用イムノクロマトキット（CD81）

[品番：DNT-EXO-K03]

使用方法説明書

取り扱い上の注意

- 本製品は研究目的のみに使用してください。
※医薬品医療機器法の対象外のため、診断等の目的で使用することはできません。
- 高温多湿を避け、冷暗所（4℃）にて保管してください。
- イムノクロマト試験紙（内容物 No.1）は下記に注意してご使用ください。
 - ①火気のそばで使用しないこと
 - ②湿らせてから廃棄すること
 - ③常温保管を避けること
 - ④直射日光を避けること
 - ⑤衝撃・摩擦を避けること
- 地域の条例に従った廃液・廃棄物処理を行ってください。
- 推奨された個人用保護具（白衣、保護眼鏡、マスク、ゴム手袋など）を着用してください。
- 取扱い後はよく手を洗ってください。
- 粉じんなどを吸入しないよう注意してください。
- 溶液等が眼や口に入った場合、直ちに水で数分間注意深くすすいでください。
刺激が続く場合は、医師の診断・手当てを受けてください。

➤ 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	CD81 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 (CD81) [凍結乾燥品]	1 本 (1400μL 相当) ^{※3}
3	標準物質 (CD81 Peptide) [凍結乾燥品]	1 本 (28ng 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二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 0. 20ng/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

Step0. 準備

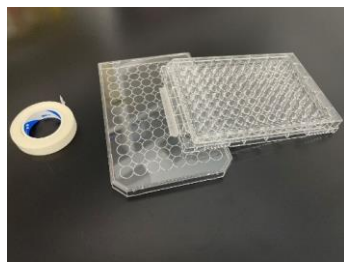


図 1-(a)

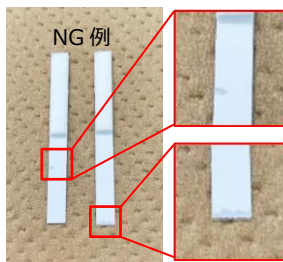


図 1-(b)

1. マイクロプレートを設定する。[図 1-(a)]
☞ フタを下に置くなどして、傾斜を作ると試料を展開しやすくなる。
2. 必要な枚数の試験紙を取り出す。大きな剥がれのあるものは使用しない。[図 1-(b)]

Step1. 試料の展開

10min.

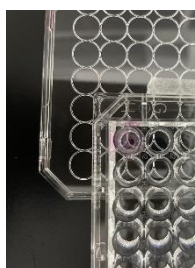


図 2-(a)

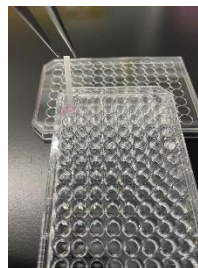


図 2-(b)

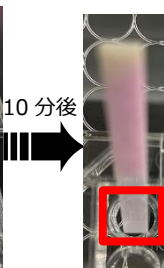


図 2-(c)

1. 標準物質溶液(CD81 Peptide 溶液)と検体溶液を、各ウェルに 20 μ L 注入する。[図 2-(a)]
2. 吸水紙を上にして、試験紙を各ウェルにセットする。[図 2-(b)]
3. ウェルの中の溶液がなくなったのを確認する。[図 2-(c)]
☞ 試料の展開が終わったら、試験紙が乾燥しないよう直ちに次のステップに進む。

Step2. 洗浄液の展開 (1 回目)

5min.



図 3-(a)

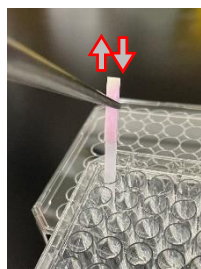


図 3-(b)

Step1 と同じウェルに洗浄液を 10 μ L ずつ注入する。[図 3-(a)]

- ☞ 洗浄液 (液滴) がウェルの底面に落ちていることを確認する。
- ☞ 試験紙をピンセットで一度持ち上げて、再度同じウェルに入れると、速く吸水される。[図 3-(b)]

Step3. 金ナノプレート標識抗体の展開

15min.



図 4-(a)

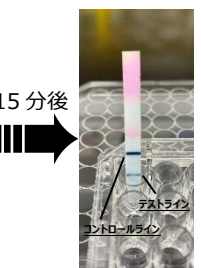


図 4-(b)

1. Step1, 2 と同じウェルに金ナノプレート標識抗体溶液を、30 μ L ずつ注入する。[図 4-(a)]
☞ Step2 に記載している注意点を参照。
2. 金ナノプレート標識抗体溶液が展開されると、次第にテストライン (下側) ・コントロールライン (上側) が呈色する。[図 4-(b)]

Step4. 洗浄液の展開 (2 回目)

15min.

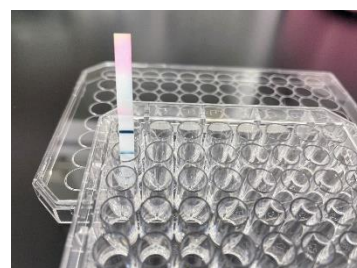


図 5

新しいウェルに洗浄液を、各ウェルに 50 μ L ずつ注入する。[図 5]

- ☞ Step2 に記載している注意点をご参照。

解析

➤ プロトコル

＜検出試験＞

1 標準物質(CD81 Peptide)溶液の調製 (検量線用)

CD81 Peptide [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 4.0ng/20μL、以下 CD81 peptide 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標準物質希釈液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)、0.5 (希釈液③)、1 (希釈液②)、2 (希釈液①) [ng/20μL] の 4 点とする。

表 1. 標準物質希釈溶液調製表 (n=3 の場合※6)

略称	CD81 peptide 濃度 (ng/20μL)	希釈液の調製表 (μL)				調製量 (μL)	最終液量 (μL)
		CD81 peptide原液 (4.0ng/20μL)	希釈液① (2.0ng/20μL)	希釈液② (1.0ng/20μL)	検体希釈液		
希釈液①	2.0	65	-	-	65	130	75
希釈液②	1.0	-	55	-	55	110	75
希釈液③	0.5	-	-	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 標準物質溶液の調製」で調製した各濃度の CD81 Peptide 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。

標準物質の検出結果から検量線を作成し、検体中の細胞外小胞量 (CD81 相当量) を算出する。

※6. n=3 での試験を推奨しております。

※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：https://www.holdings.toppan.com/ja/news/2024/02/newsrelease240227_1.html)

※8. ImageJ による解析手法は次ページを参照。

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「ImageJ」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。

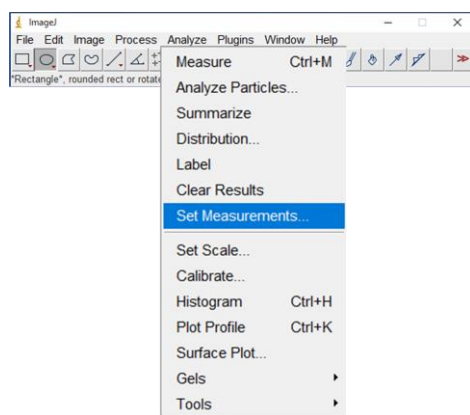


図 6-(a)

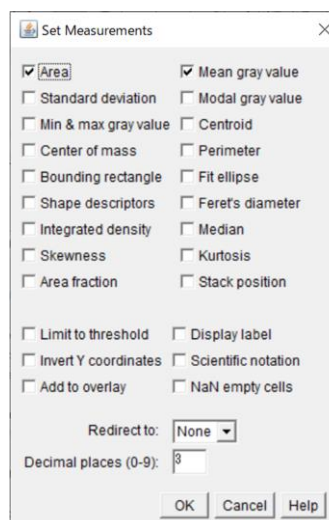


図 6-(b)

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ことがあるため、JPEG 形式に変換してから使用する。

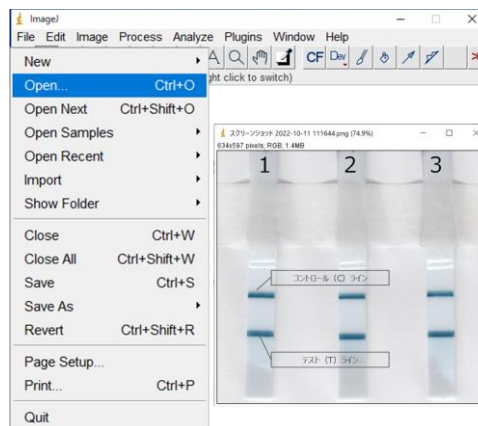
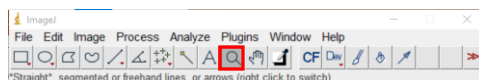


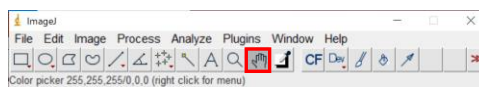
図 7

拡大鏡ツール



解析したい画像をズームインしたいときは、このツールで画像をクリックする。

スクロールツール



ウィンドウの中の画像を動かしたいときは、このツールを選択し動かす

※上記ツール使用後に解析を続行する場合は矩形 ROI を選びなおしてから行う。

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。

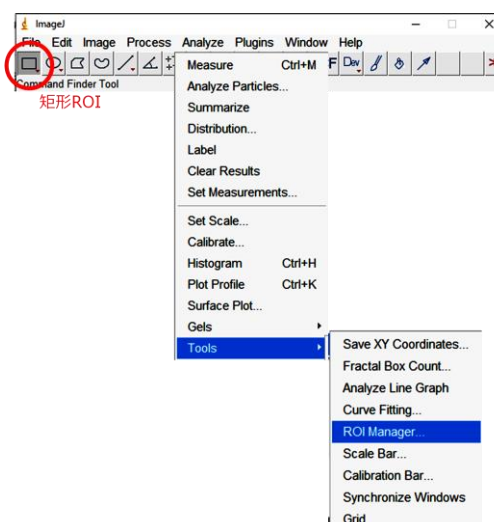


図 8

5 テストライン、バックグラウンドの輝度測定

① 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 ROI 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。

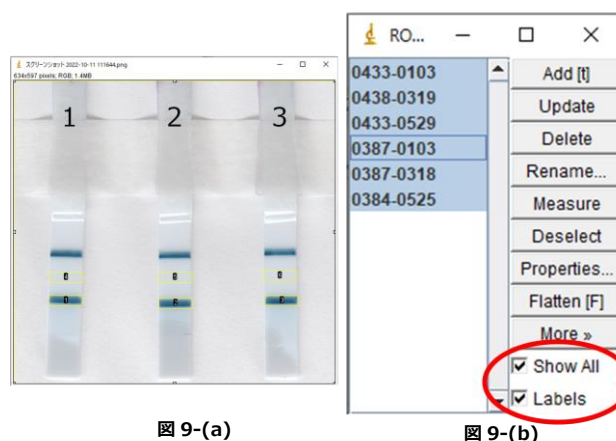


図 9-(a)

図 9-(b)

※9. 検出量が少ない場合、テストライン中央部が薄くなる場合がございますが、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。

Figure 10(a) shows the Results window. It has a table with columns: File, Edit, Font, Results. The Results column has a sub-table with columns: Area, Mean. The data is as follows:

	Area	Mean
1	1386	141.690
2	1386	137.946
3	1386	137.587
4	1386	218.653
5	1386	218.232
6	1386	219.708

Figure 10(b) shows an Excel spreadsheet. It has columns: A, B, C, D, E, F, G. The data is as follows:

	A	B	C	D	E	F	G
1							
2							
3		メンブレンNo.		Area	Mean	輝度	
4		1	1	1386	141.69	=E7-E4	
5	テストライン→	2	2	1386	137.95	80.286	
6		3	3	1386	137.59	82.121	
7		1	4	1386	218.65		
8	バックグラウンド→	2	5	1386	218.23		
9		3	6	1386	219.71		
10							
11							
12							

Red text in the Excel spreadsheet: Result窓から貼り付けた部分

図 10-(a)

図 10-(b)

7 検体に含まれる細胞外小胞の定量

CD81 Peptide 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 (CD81 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

スペシャルティ事業部門 新事業開拓部

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