

EV-Perm™ Permeabilization Pretreatment Kit for Exosome Membrane

【Product Information】

Code No.	Product Name	Volume	Storage
294-85701	EV-Perm™ Permeabilization Pretreatment Kit for Exosome Membrane	1 kit	Frozen (-20℃)

【Kit Contents】

Reagent	Volume	Storage
Reagent A (20×)	500 μL×1	Frozen (-20℃)
Reagent B (10×)	5 mL×1	Before thawing : -20℃ After thawing : 2~10℃
Reagent C (100×)	500 μL×1	Before thawing : -20℃ After thawing : 2~10℃

【How to store each reagent】

Store each reagent according to the storage condition above.

Preparation of reagents

1. Reagent A (20×)

Following thaw, mix the vial by gently tapping, and prepare aliquots. Close the lid tightly and immediately store the remaining solution in the freezer (-20℃).

- If stored in a liquid state for a long time, components may precipitate.
- If precipitation is observed, heat it at 60℃ for about 30 minutes to dissolve it, then store it in the freezer.

2. Reagent B (10×) and Reagent C (100×)

Following thaw, mix the vial by gently tapping, and prepare aliquots. Close the lid tightly and immediately store the remaining solution in the refrigerator (2~10℃).

[About this product]

This product is a reagent that enables the detection of internal markers of extracellular vesicles. Until now, the detection targets of the PS Capture™ Exosome ELISA Kit Series and PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit were limited to the detection of surface markers of extracellular vesicles. However, when used in combination with this product, it is possible to improve the permeability of the extracellular vesicle membrane surface and detect internal markers.

For PS Capture™ Exosome ELISA Kit

[Equipment and reagents to be supplied by user]

① ELISA Kit (Check) :

- One of the following kits

Code No.	Product Name
297-79201	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Anti Mouse IgG POD)
298-80601	PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)

② Reagents (Check) :

- Distilled Water
 Specific antibody for Extracellular vesicle internal protein

If using the PS Capture™ Exosome ELISA Kit (anti-mouse IgG POD), please prepare a mouse monoclonal antibody, and if using the PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP), prepare a biotin-labeled antibody.

③ PS Capture™ Exosome ELISA Kit included reagents

- Washing Buffer (10×)
 Exosome Binding Enhancer (100×)
 Reaction Buffer

Please use the Exosome Binding Enhancer and Reaction Buffer in the PS Capture™ Exosome ELISA Kit. Even if you use Buffer with this kit, you will still have Buffer for the PS Capture™ Exosome ELISA Kit.

④ Equipments (Check) :

- Microwell plate (PS Capture™ Exosome ELISA kit accessory)
 Plate seal (PS Capture™ Exosome ELISA kit accessory)
 Microplate shaker
 Microplate reader

【Preparation of samples】

For PS Capture™ Exosome ELISA Kit (anti-mouse IgG POD)

It is necessary to optimize the concentration of extracellular vesicles used to detect the target marker using this product. The optimal concentration of extracellular vesicles was determined using the PS Capture™ Exosome ELISA kit (anti-mouse IgG POD) such that the resulting absorbance (450 nm minus 620 nm) was in the range of 0.2 to 2.5. Prepare. To adjust the concentration of extracellular vesicles, dilute them with the reaction/wash solution (1x) included in the kit.

For PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP)

It is necessary to optimize the concentration of extracellular vesicles used to detect the target marker using this product. The optimal concentration of extracellular vesicles was measured using the PS Capture™ Exosome ELISA Kit (Streptavidin HRP) and adjusted so that the resulting absorbance (450 nm minus 620 nm) was in the range of 0.2 to 2.5. To do. To prepare the concentration of extracellular vesicles, dilute at least two times with the Reaction Buffer included in the kit.

【Preparation of reagents】

1. Preparation of permeabilization solution

Dilute each reagent, referring to Table 1 below. After dilution, mix well. Table 1. Dilution ratio and amount of reagent added for each reagent used in permeabilization solution

Reagent	Dilution	12 samples* (24 wells)	24 samples* (48 wells)	48 samples* (96 wells)
Distilled Water	-	2.1 mL	4.2 mL	8.4 mL
Reagent A (20×)	1:20	125 µL	250 µL	500 µL
Reagent B (10×)	1:10	250 µL	500 µL	1.0 mL
Reagent C (100×)	1:100	25 µL	50 µL	100 µL
Total	-	2.5 mL	5.0 mL	10.0 mL

※ For performing in duplicate.

2. Preparation of negative control solution

Dilute each reagent referring to Table 2 below. After diluting, mix well

(Do not add Reagent A when preparing the negative control solution.)

Table 2. Dilution ratio and amount of reagent added for each reagent used for negative control

Reagent	Dilution	12 samples* (24 wells)	24 samples* (48 wells)	48 samples* (96 wells)
Distilled Water	-	2.2 mL	4.5 mL	8.9 mL
Reagent B (10×)	1:10	250 µL	500 µL	1.0 mL
Reagent C (100×)	1:100	25 µL	50 µL	100 µL
Total	-	2.5 mL	5.0 mL	10.0 mL

※ For performing in duplicate.

3. Preparation of washing solution (1x)

Washing Buffer (10x) included with the PS Capture™ Exosome ELISA Kit was diluted 10 times with purified water. After that, add 1/100 amount of Exosome Binding Enhancer (100x) to the diluted solution and mix well. 10

【Procedure】

1. Process Flow

Process		Reagent · Equipment	Time
1.	Capture Exosome	Washing the plate	Washing buffer (1×)
		Capture Exosome on the plate	Sample Capture (1× Reaction Buffer)
		Washing the plate	Washing buffer (1×)
2.	Permeabilization	Permeabilization*	① permeabilization solution ② negative control solution
		Washing the plate	Washing buffer (1×)

※ The permeabilization solution and negative control solution are separate for each sample and detection condition in the permeabilization process.

The following steps are performed according to the PS Capture™ Exosome ELISA kit.

Process		Reagent · Equipment	Time
3.	1st antibody reaction	1st antibody reaction	Add detection antibody
		Washing the plate	Washing buffer (1×)
4.	2nd antibody / streptavidin-HRP reaction	2nd antibody / streptavidin-HRP reaction	2nd antibody / streptavidin-HRP reaction
		Washing the plate	Washing buffer (1×)
5.	Substrate	Substrate addition	TMB Solution Stop Solution
		ELISA plate reading	microplate reader

2. The procedure of #2 permeabilization in the process flow above.

- (1) Follow the instructions for the PS Capture™ Exosome ELISA kit and proceed to the washing step Procedure# 4 before adding the 1st antibody reaction solution.
- (2) Add 100 µL of permeabilization solution or 100 µL of negative control solution to the extracellular vesicle sample (well).

- (3) Apply a plate seal and incubate at room temperature for 1 hour while stirring at 500 rpm using a microplate shaker.
- (4) Decant the reaction solution and wash each well three times with 300-350 μ L of washing solution (1x).
- (5) From the process flow "3. 1st antibody reaction", proceed to step "[Procedure] 5)" according to the PS Capture™ Exosome ELISA Kit instruction manual.

Please refer to the PS Capture™ Exosome ELISA Kit Instruction Manual for post-measurement calculations and analysis methods.

For PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit

【キット以外に準備するもの】

① フローサイトメトリーキット（チェック欄）：

使用するキット

コード No.	品名
297-79701	PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット

② 試薬内訳（チェック欄）：

精製水（蒸留水）

任意の細胞外小胞の内部マーカー検出抗体

蛍光標識抗体をご用意ください。

③ PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット付属試薬

Washing Buffer（10×）

Exosome Binding Enhancer（100×）

細胞外小胞結合磁気ビーズ

Exosome Binding Enhancer は PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキットに付属のものをご使用下さい。本キットに Buffer を使用しても PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキットで使用する Buffer が足りなくなることはありません。

④ 器具内訳（チェック欄）：

遠沈管（15 mL）

マイクロチューブ（1.5 mL）

ボルテックスミキサー

卓上遠心機

磁気スタンド

【試薬の準備】

1. 透過処理液の調製

下記の表 1 を参照し、各試薬を希釈する。希釈後、よく混合する。

表 1. 透過処理液に用いる各試薬の希釈倍率と試薬添加量

試薬名	希釈倍率	2 反応分 (添加量 100 μ L) ※	4 反応分 (添加量 167 μ L) ※	8 反応分 (添加量 300 μ L) ※
精製水 (蒸留水)	-	126 μ L	184.8 μ L	294 μ L
Reagent A (20 \times)	20 倍	7.5 μ L	11 μ L	17.5 μ L
Reagent B (10 \times)	10 倍	15 μ L	22 μ L	35 μ L
Reagent C (100 \times)	100 倍	1.5 μ L	2.2 μ L	3.5 μ L
Total	-	150 μL	220 μL	350 μL

※ 添加量は、PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキットの取扱説明書の表 2「サンプル (μ L)」をご参照ください。

2. ネガティブコントロール溶液の調製

下記の表 2 を参照し、各試薬を希釈する。希釈後、よく混合する。

(ネガティブコントロール溶液の調製には Reagent A は添加しない)

表 2. ネガティブコントロールに用いる各試薬の希釈倍率と試薬添加量※

試薬名	希釈倍率	2 反応分 (添加量 100 μ L) ※	4 反応分 (添加量 167 μ L) ※	8 反応分 (添加量 300 μ L) ※
精製水 (蒸留水)	-	133.5 μ L	195.8 μ L	311.5 μ L
Reagent B (10 \times)	10 倍	15 μ L	22 μ L	35 μ L
Reagent C (100 \times)	100 倍	1.5 μ L	2.2 μ L	3.5 μ L
Total	-	150 μL	220 μL	350 μL

※ 添加量は、PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキットの取扱説明書の表 2「サンプル (μ L)」をご参照ください。

3. WB (+Enhancer) の調製

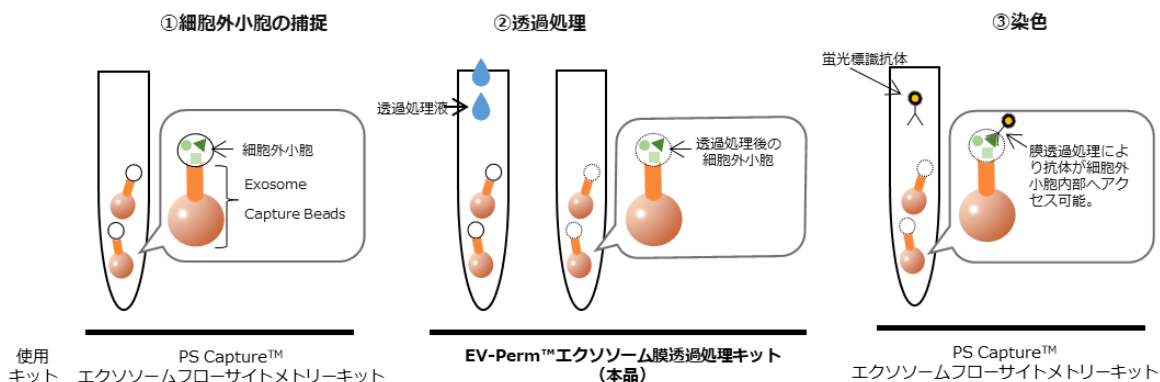
15mL 遠沈管に 0.5 mL の Washing Buffer (10 \times) と 4.5mL の精製水を加えてボルテックスで混合する。さらに 50 μ L (1/100 容量) の Exosome Binding Enhancer (100 \times) を添加し、ボルテックスミキサーで混合する。

1.5 mL マイクロチューブを用いた反応系（2 反応分）の場合の液量です。反応スケールを大きくする場合は PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit 付属の取扱説明書 表 2 に従いスケールアップさせてください。

4. 細胞外小胞結合磁気ビーズの調製

PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット付属の取扱説明書「2. 細胞外小胞の単離」に従って準備してください。

【反応フロー図】



【操作手順】

1. 工程フロー

工程		使用試薬・機器	時間
1.	細胞外小胞の単離	細胞外小胞の単離	>70 分間
		細胞外小胞の捕捉	
2.	透過処理 (本キットを使用)	① 透過処理液	>1 時間
		② ネガティブコントロール溶液	
	洗浄	WB (+Enhancer)	

以下の工程は、PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキットに従い実施する。

工程		使用試薬・機器	時間
3.	細胞外小胞の染色	蛍光標識アイソタイプコントロール抗体 もしくは 蛍光標識細胞外小胞マーカー検出用抗体	>1 時間
		洗浄	
4.	解析	解析	フローサイトメトリー機器

※ 透過処理工程では、各サンプルおよび検出条件ごとに透過処理液およびネガティブコントロール溶液をそれぞれ反応させてください

2. 操作方法（工程フロー「2. 透過処理」、1 種類の細胞外小胞マーカーを解析する場合）

- (1) PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキットの取扱説明書に従い、6 反応分の細胞外小胞磁気ビーズ（700 µL）を作製するため、「2. 細胞外小胞の単離」まで進める。
- (2) 300 µL の細胞外小胞結合磁気ビーズを 2 本のマイクロチューブに分注する。
- (3) マイクロチューブを遠心し、磁気ビーズをスピンドウンする。
- (4) 専用の磁気スタンドにマイクロチューブを 1 分間静置し、上清をピペットで除く。
- (5) 300 µL の WB (+Enhancer) をマイクロチューブに加え、ボルテックスで混和する。
- (6) (3)~(5)の作業を 2 回繰り返す。
- (7) 100µL の透過処理液または 100 µL のネガティブコントロール溶液を各々のチューブに添加し、ボルテックスで混和する。
- (8) (7)のマイクロチューブを室温に静置し、20 分後、40 分後のタイミングでボルテックスで混和し、計 1 時間かけてエクソソームを透過処理する。
- (9) (8) のマイクロチューブを遠心し、磁気ビーズをスピンドウンする。
- (10) 専用の磁気スタンドにマイクロチューブを 1 分間静置し、上清をピペットで除く。
- (11) 300 µL の WB (+Enhancer) をマイクロチューブに加え、ボルテックスで洗浄する。
- (12) (10)~(11)の洗浄を 2 回繰り返す。
- (13) 300 µL の WB (+Enhancer) をマイクロチューブに加え、ボルテックスで混和する。
- (14) 工程フロー「3.細胞外小胞の染色」からは、PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット取扱説明書に従い、「3.細胞外小胞の染色」の工程に進む

測定後の計算や解析方法については PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット取扱説明書をご確認ください。

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪府中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

2211.KAI01