



研究用

LeukoCompleteTM

A Cell-mediated immune response assay kit based on RT-qPCR

取扱説明書

本製品は研究用試薬であり、それ以外の目的には使用しないでください。
この取扱説明書をよく読んでから使用してください。

1. キット構成

● LeukoComplete™ Plate Kit

構成品	容量
Antigen-Coated Plate for SARS-CoV-2 ^{※1}	1 plate
Leukocyte Isolation Plate (filter plate)	1 plate
mRNA Capture Plate	1 plate
Lysis Buffer	6 mL × 1 本
Proteinase K	30 µL × 1 本
TCEP	300 µL × 1 本
Wash Buffer A	30 mL × 1 本
Wash Buffer B	50 mL × 1 本
PT Buffer	15 mL × 1 本
Deep Well Plate	1 plate
Aluminum Seal	1 枚

※1 オプション製品

貯蔵方法：2～30℃

● LeukoComplete™ RT and PCR Kit

構成品	容量
RT Buffer	1.5 mL × 2 本
M-MLV Reverse Transcriptase	40 µL × 1 本
RNase Inhibitor	10 µL × 1 本
ACTB Primer Mix	100 µL × 1 本
IFNG Primer Mix	100 µL × 1 本

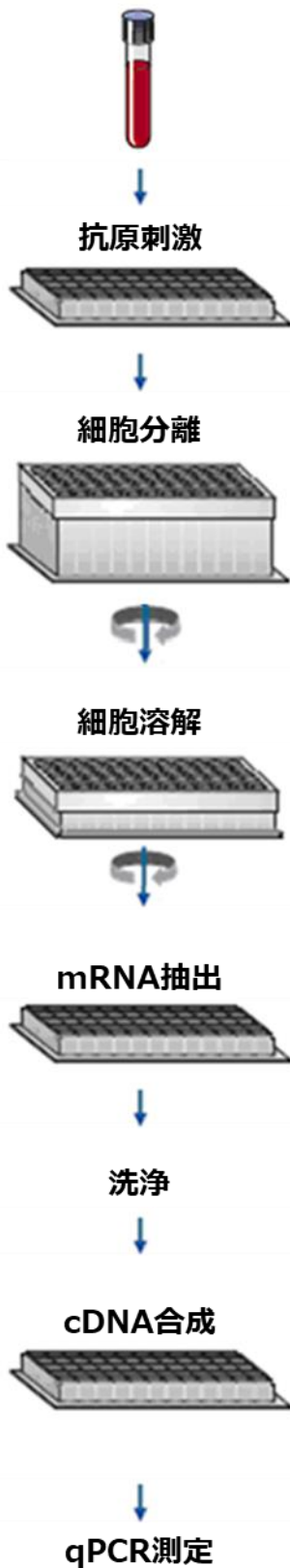
貯蔵方法：-10℃～-30℃

※ PCR 酵素は別途購入下さい。（SsoAdvanced™ Universal qPCR Supermix (Bio-Rad) #1725270 を推奨）

2. 機器及び器具類

- 遠心機（プレート用スイングローター）
- インキュベーター（37℃）
- バキュームポンプ、デシケーター（推奨）
- アイスパン
- 8チャンネルアスピレーター（推奨）
- マイクロピペット（8チャンネル）及び疎水性フィルター付きチップ（サンプル・試薬添加時は8チャンネルマイクロピペットの使用を推奨）
- リアルタイムPCR装置（Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) 等）及び消耗品

3. 操作の概要



Step 1 抗原刺激 (オプション製品を使用した場合)

1. Antigen-Coated Plate for SARS-CoV-2 (抗原乾燥プレート) を室温に戻す。
2. 室温に戻した全血 (ヘパリン血) を抗原乾燥プレートに 120 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加する (採血から 24 時間以内)。
3. 37°C で 4 時間静置する。
4. Step2 の実施、または -80°C で保管する。

Step 2 細胞分離

1. Leukocyte Isolation Plate (filter plate) を Deep Well Plate の上に乗せる。
2. 冷えた PT Buffer を filter plate に 150 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加する。
3. 2,500g、4°C で 1 分間遠心を行う。
4. Step1 で刺激を行った全血を filter plate に 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加する。(全血を凍結保管した場合は、室温で 30 分間静置し、溶解する。)
5. 2-8°C で 10 分間静置する。
6. 2,500g、4°C で 2 分間遠心を行う。

Step 3 細胞溶解

1. filter plate を mRNA Capture Plate の上に乗せる。
2. Lysis Buffer 溶液を filter plate に 60 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、フタをする。
3. 37°C で 10 分間静置する。

Step 4 mRNA 抽出

1. 2,500g、4°C で 5 分間遠心を行う。
2. mRNA Capture Plate にフタをし、2-8°C で一晩 (>16 時間) 静置する。

Step 5 洗浄

1. 氷上で mRNA Capture Plate を洗浄する。
 - Wash Buffer A (冷蔵) を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加・吸引を 3 回繰り返す。
 - Wash Buffer B (冷蔵) を 150 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加・3 分間静置・吸引を 3 回繰り返す。
2. 残液を各ウェルから取り除く。
3. 室温で 10 分間真空乾燥を行う。

Step 6 cDNA 合成

1. 逆転写反応液を mRNA Capture Plate に 30 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、アルミシールをする。
2. 2,000g で 30 秒間遠心を行う。
3. 37°C で 2 時間静置する。
4. 2,000g で 30 秒間遠心を行う。
5. Step7 の実施、または -20°C で保管する。

Step 7 qPCR 測定

1. 2 \times qPCR ミックスをプライマーと混合し、qPCR 反応液を調製する。
2. qPCR 反応液を 96 ウェル PCR プレートに 6 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加する。
3. Step6 で合成した cDNA 溶液を 4 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、混合する。
4. プレートにシールを貼り、2,000g で 30 秒間遠心する。
5. リアルタイム PCR 装置にセットし、qPCR を行う。

4. 操作方法

● Step 1 抗原刺激

<オプション製品を使用した場合>

1. Antigen-Coated Plate for SARS-CoV-2 (抗原乾燥プレート) を室温に戻す。
2. 室温に戻した全血 (ヘパリン血) を、下記の抗原乾燥プレート図を参考に 1test 4well 分、120 μ L/well 添加する (採血から 24 時間以内)。添加の際は、泡立たないように数回ピペティングする。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A						Nega Con.						
B	1test分					従来株S蛋白由来ペプチド						
C						変異株(オミクロン株)S蛋白由来ペプチド						
D						Posi Con.						
E						Nega Con.						
F						従来株S蛋白由来ペプチド						
G						変異株(オミクロン株)S蛋白由来ペプチド						
H						Posi Con.						

3. 37°Cで 4 時間静置する。
4. Step2 の実施、または-80°Cで保管する。

<オプション製品を使用しない場合> ※抗原濃度、刺激時間等の条件は事前に検討する必要があります。

1. 室温に戻した全血 (ヘパリン血) に、濃度調製した抗原を添加する(採血から 24 時間以内)。
(濃度例)

抗原ペプチド溶液濃度 : 20 μ g peptide/mL (溶媒として 20%DMSO/PBS を使用)

全血中の終濃度 : 0.8 μ g peptide /mL

2. 37°Cで静置する。
3. Step2 の実施、または-80°Cで保管する。

● Step 2 細胞分離

1. Leukocyte Isolation Plate (filter plate) を Deep Well Plate の上に乗せる。
2. 冷えた PT Buffer を filter plate に 150 μ L/well 添加する。
3. 2,500g、4°Cで 1 分間遠心を行う。(2,000g、4°C、3 分でも可)
4. Step1 で刺激を行った全血を filter plate に 100 μ L/well 添加する。(全血を凍結保管した場合は、室温で 30 分間静置し、溶解する。)
5. 2-8°Cで 10 分間静置する。
6. 2,500g、4°Cで 2 分間遠心を行う。(2,000g、4°C、10 分でも可)

● Step 3 細胞溶解

1. Deep Well Plate を取り除き、filter plate を mRNA Capture Plate の上に乗せる。
2. 試薬を下記容量で混合し Lysis Buffer 溶液を調製する。

Lysis Buffer 溶液	per well	調製液量 (e.g. 20 反応)
Lysis Buffer	56.7 μ L	1134 μ L
Proteinase K	0.3 μ L	6.0 μ L
TCEP	3.0 μ L	60 μ L
Total	60 μ L	1200 μ L

※Lysis Buffer に白い析出物を認める場合は、37℃で温め十分に溶解してから4℃で保管し使用する。

※反応液は必要なサンプル数分よりも多めに調製する。

3. Lysis Buffer 溶液を filter plate に 60 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、フタをする。

4. 37℃で 10 分間静置する。

● Step 4 mRNA 抽出

1. 2,500g、4℃で 5 分間遠心を行う。(2,000g、4℃、15 分でも可)

2. filter plate を取り除き、mRNA Capture Plate にフタをする。

3. mRNA Capture Plate を、2-8℃で一晩 (>16 時間) 静置する。

● Step 5 洗浄

1. mRNA Capture Plate 及び、Wash Buffer A と Wash Buffer B を、氷を詰めたアイスパンに置く。

※Wash Buffer A に白い沈殿が析出している場合は、37℃で温め十分に溶解してから4℃で保管し使用する。

※プレートと Wash Buffer は冷たい状態を保つようにする。

2. mRNA Capture Plate の溶解液を吸引する。

3. Wash Buffer A (冷蔵) を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加・吸引を 3 回繰り返す。

4. Wash Buffer B (冷蔵) を 150 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加・3 分間静置・吸引を 3 回繰り返す。

5. 紙タオル等の上にプレートを逆さにしてたたきつけ、ウェル内水滴を完全に除去する。

6. バキュームポンプ及び、デシケーターを用いて室温、10 分間真空乾燥を行う。

● Step 6 cDNA 合成

1. 試薬を下記容量で混合し逆転写反応液を調製する。

逆転写反応液	per well	調製液量 (e.g. 20 反応)
RT Buffer A	29.5 μL	590 μL
M-MLV Reverse Transcriptase	0.4 μL	8.0 μL
RNase Inhibitor	0.1 μL	2.0 μL
Total	30 μL	600 μL

※反応液は必要なサンプル数分よりも多めに調製する。

2. 逆転写反応液を mRNA Capture Plate に 30 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、Aluminum Seal をする。

3. 2,000g で 30 秒間遠心を行う。

4. 37℃で 2 時間静置する。

5. 2,000g で 30 秒間遠心を行う。

6. Step7 の実施、または-20℃で保管する。

● Step 7 qPCR 測定

1. 試薬を下記容量で混合し qPCR 反応液を調製する。

qPCR 反応液	per well	調製液量 (e.g. 20 反応)
PCR 酵素 (2×)	5.0 μL	100 μL
ACTB Primer Mix or IFNG Primer Mix	1.0 μL	20 μL
Total	6.0 μL	120 μL

※反応液は必要なサンプル数分よりも多めに調製する。

2. qPCR 反応液を 96 ウェル PCR プレーットの ACTB および IFNG 対応ウェルに各 6 μL/well 添加する。
 3. Step6 で合成した cDNA 溶液を 4 μL/well 添加し、混合する。
 4. プレー트에シールを貼り、2,000g で 30 秒間遠心する。
 5. リアルタイム PCR 装置にセットし、下記パラメータ条件で qPCR を行う。

Standard mode (IFNG、ACTB の検出)

Stage 1	95°C 10min	-
Stage 2	95°C 30sec	40 cycles
	65°C 1min	
Stage 3	95°C 15sec	Melt curve stage
	60°C 1min	
	95°C 30sec	
	60°C 15sec	

Fast mode (ACTB の検出)

Stage 1	95°C 20sec	-
Stage 2	95°C 3sec	40 cycles
	65°C 30sec	
Stage 3	95°C 15sec	Melt curve stage
	60°C 1min	
	95°C 15sec	
	60°C 15sec	

6. (解析例) 下記の式より、刺激抗原に対する IFNG の遺伝子検出量を算出する。

$$\Delta Ct = IFNG Ct - ACTB Ct$$

$$IFNG \text{ 遺伝子検出量 } (-\Delta\Delta Ct) = -(\text{抗原刺激サンプル} \Delta Ct - \text{Negative Control} \Delta Ct)$$

5. 使用上又は取扱い上の注意

- 本キットはヒト全血サンプル用に設計されたものになりますが、末梢血単核球、または他の動物種で検討されたい場合は別途お問い合わせ下さい。
- 細胞性免疫検査ではヘパリン血を使用することが一般的であるため、ヘパリン血の使用を推奨します。
- ペプチド溶液の溶媒には PBS、DMSO、またはその混合物の使用を推奨します。なお、全血中の DMSO 濃度は 1% 以下になるように調整して下さい。

- 凍結試薬は、溶解後よく混合し、軽くスピンドウンしてからご使用下さい。
- mRNA Capture Plate はステップとステップの間に長時間放置しないで下さい。プロトコルを開始したら、完了まで連続して行って下さい。
- リアルタイム PCR による検出は非常に高感度であるため、実験環境や使用器具の汚染には極力注意を払い、コンタミネーションの防止に心がけて下さい。
- サンプル溶液や試薬間のコンタミネーションを避けるため、サンプル溶液や試薬類の分注に際しては疎水性フィルター付きチップを使用し、十分注意して行って下さい。
- 微生物等のコンタミネーションを避けて下さい（微生物やヒトの汗や唾液に含まれるヌクレアーゼが少量でもサンプル溶液に混入すると、RNA が分解され測定結果に誤りが生じる可能性があります）。
- 検体及び本キットを取扱うときには、マスク及びディスポーザブルゴム手袋（パウダーフリー）、実験着及び保護眼鏡を着けて操作し、試薬が皮膚、目及び粘膜等に触れないように注意して下さい。また、取扱い後は手をよく洗って下さい。
- リアルタイム PCR 装置の取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従って下さい。
- 使用後の容器を廃棄する場合には、各都道府県によって定められた廃棄物に関する規定に従い医療廃棄物又は産業廃棄物など区別して処理して下さい。

6. その他の注意

- 本キットは開発品であるため、今後の検討によりその仕様、設計、内容等を変更する場合があります。
- 本キットは研究目的にのみ使用し、商業的、工業的用途、または臨床診断および治療への使用やサービスには使用しないで下さい。
- 本キットにつきましては、分析/解析、またはリバースエンジニアリングをしないで下さい。
- 本キットに関する一切の権利（所有権、特許等の知的財産権等）は弊社に帰属します。
- 本キットに起因する、ご利用者様又はその他の第三者に発生した損害については、弊社は一切責任を負いません。
- 本キットの法適合性を含む用途適性につきましては、ご利用者様にてご判断下さい。
- ご利用者様が本書に規定する義務に違反した場合、弊社はご利用様に対し、当該違反に起因又は関連して被った損害の賠償を請求いたします。
- ご利用者様が反社会的勢力と社会的に非難されるべき関係を有さず、かつ将来にわたっても該当しないこと、並びに各国及び各地域の贈収賄防止法を含む法令に違反する行為を行わないことを表明し保証いただきます。

7. 参考文献

- Mitsuhashi M, Tomozawa S, Endo K, Shinagawa A. Quantification of mRNA in whole blood by assessing recovery of RNA and efficiency of cDNA synthesis. *Clin Chem*. 2006 Apr;52(4):634-42.
- Mitsuhashi M. Ex vivo simulation of leukocyte function: stimulation of specific subset of leukocytes in whole blood followed by the measurement of function-associated mRNAs. *J Immunol Methods*. 2010 Dec 15;363(1):95-100.

8. 問い合わせ先

ミナリスメディカル株式会社 研究開発本部

TEL 055-988-6018 FAX 055-988-6020