

LeukoComplete™

RUO

Cellular immunity assay kit based on gene detection

- LeukoComplete™ Plate and RT Kit
- LeukoComplete™ Antigen Coated Plate
- LeukoComplete™ Gene Detection Kit

Instruction for Use

Introduction

Thank you for purchasing this kit.

We recommend the methods described in this instruction manual for use.

This product is sold **for research purposes only** and cannot be used for any other purpose.

LeukoComplete™

A series of LeukoComplete™ products is specifically designed to evaluate cell-mediated immune response by quantifying mRNA. LeukoComplete™ Plate and RT Kit isolates immune cells from sample, extracts the mRNA, and synthesizes cDNA from the mRNA as the template. Multiple mRNA genes of interest can be quantified with the synthesized cDNA by LeukoComplete™ Gene Detection Kit.

As a practical application, we report the kit is useful for the implementation of Ex vivo Activation of Gene in Leukocyte (EAGL) method.^[1] The high performance with clinical samples is realized with our 2 proprietary plates: Leukocyte Isolation Plate and mRNA Capture Plate in LeukoComplete™ Plate and RT Kit.^[2]

Feature

<High sensitivity & Data quality>

- mRNA amplification and quantification by RT-qPCR
- Detection of immune response with <100 µL sample/well
- Antigen stimulation time as short as 4 hours
- Clinical performance comparable to ELISpot assay

<High throughput>

- The same day assay; at least 100 samples per day

<Variety of sample and target gene>

- Whole blood compatible
- cDNA sample for multiple qPCR assay
- Selection of genes of interest by using widely available primer-design tools

<Ready to use>

- No dedicated instrument
- All-in-one kit that is extensively validated for use of cell-mediated immune response assay

Table of contents

1. Kit Contents 4

2. Equipment and Supplies..... 5

3. Protocol Overview 6

4. Sample preparation and Antigen stimulation methods..... 7

5. Part A: LeukoComplete™ Plate and RT Kit 9

6. Part B: LeukoComplete™ Gene Detection Kit 11

7. Results analysis..... 12

8. Troubleshooting and Q&A..... 13

9. Precautions..... 14

10. References 15

1. Kit Contents

• LeukoComplete™ Plate and RT Kit

Component	Volume	Storage Temp.
PT Buffer	15 mL × 1	2 - 30°C
Leukocyte Isolation Plate (Filter Plate)	1	2 - 30°C
Deep Well Plate	1	2 - 30°C
Proteinase K	30 µL × 1	2 - 30°C
TCEP	300 µL × 1	2 - 30°C
Lysis Buffer	6 mL × 1	2 - 30°C
mRNA Capture Plate	1	2 - 30°C
Wash Buffer A	30 mL × 1	2 - 30°C
Wash Buffer B	50 mL × 1	2 - 30°C
Aluminum Seal	1	2 - 30°C
M-MLV Reverse Transcriptase	40 µL × 1	≤ -20°C
RNase Inhibitor	10 µL × 1	≤ -20°C
RT Buffer	1.5 mL × 2	≤ -20°C

• LeukoComplete™ Antigen Coated Plate

Component	Volume	Storage Temp.
Antigen Coated Plate for SARS-CoV-2*	1 (24 test)	2 - 30°C

* Overlap peptide pool for spike protein from SARS-CoV-2 (15 a.a, 11 overlap).

Each test requires 4 wells (blank, 2 antigens, and positive control).

• LeukoComplete™ Gene Detection Kit

Component	Volume	Storage Temp.
Primer Mix*	100 µL × 1	≤ -20°C
PCR Enzyme Mix	500 µL × 1	≤ -20°C

* Independent Cat. # is assigned to each gene.

2. Equipment and Supplies

- **Equipment**

- Centrifuge with microplate carriers and rotor
- Incubator
- Real-time PCR instrument

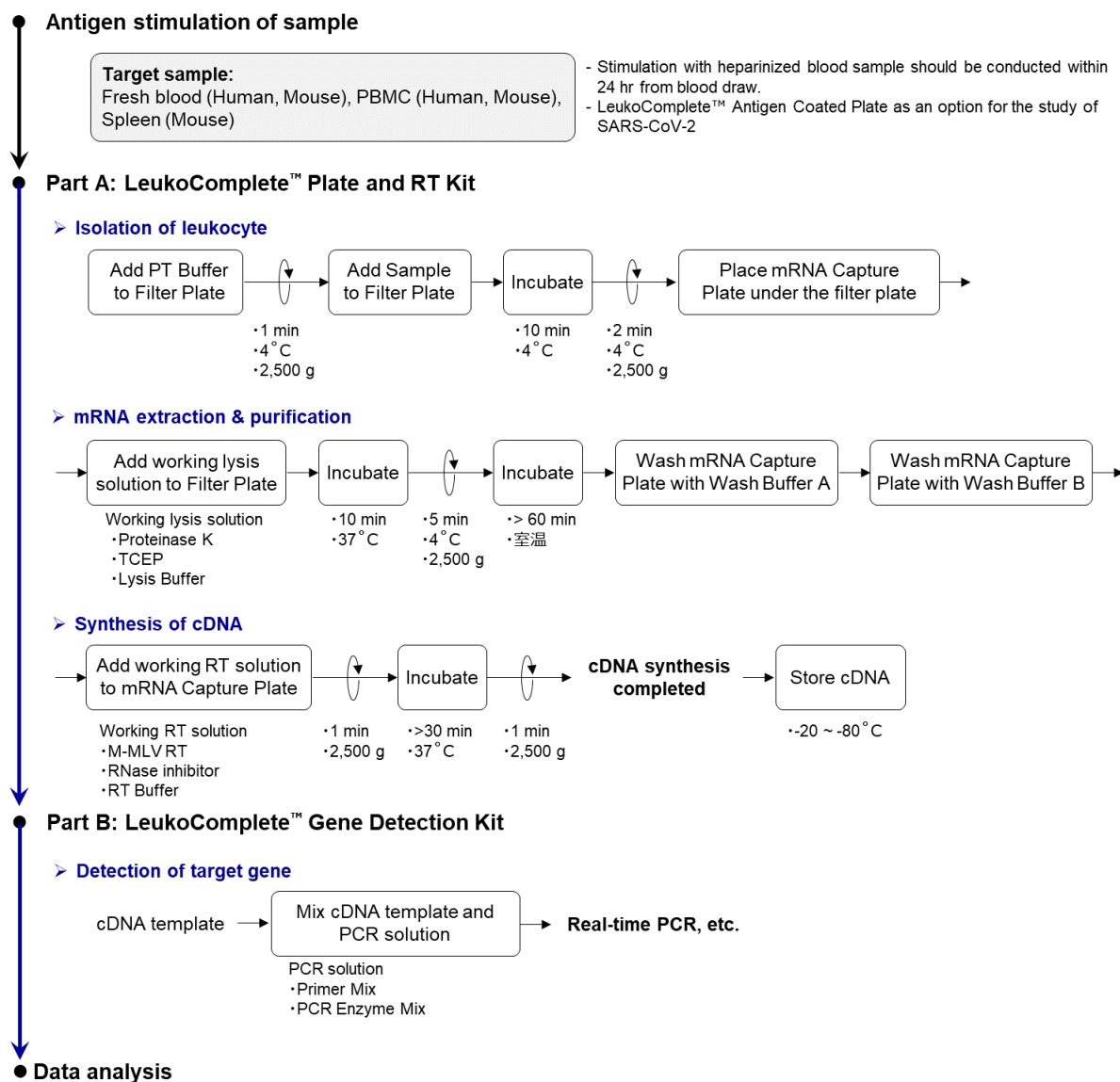
(Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.), etc.)

- **Supplies**

- Ice pan
- 8 channel pipettor
- Tip with hydrophobic filter
- Reservoir
- 96 well cell culture plate
- 96 well reaction plate for real-time PCR
- 8 channel aspirator (recommended)

3. Protocol Overview

Described below is a workflow with LeukoComplete™ products comprising 2 parts: cDNA preparation with LeukoComplete™ Plate and RT Kit (Part A) and RT-qPCR with LeukoComplete™ Gene Detection Kit (Part B).



Please refer to the following for the approximate time required for each process.

Part A: 180 min

Part B: 60 min/run (gene)

4. Sample preparation and Antigen stimulation methods

➤ Target Sample

- Whole blood* : Human, Mouse
- Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) : Human, Mouse
- Spleen Crushing Solution : Mouse

* To evaluate immune response, use heparinized blood collection tube and the fresh blood for your assay within 24 hours from blood draw.

➤ Antigen Stimulation Methods

When evaluating immune response, please consider the stimulation conditions (time, concentration, target gene) in advance.

1. Antigen solution dissolved to any concentration, blank and positive control (see Table 1) are dispensed into 96-well cell culture plate.

(Antigen Coated Plate for SARS-CoV-2 (see Figure 1) can be used instead.)

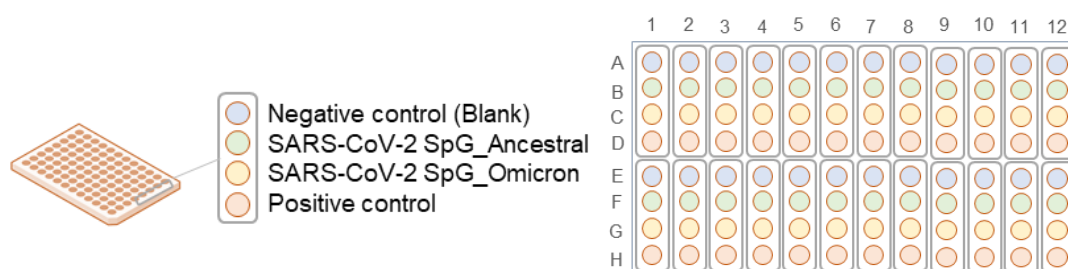


Figure 1. Antigen Coated Plate for SARS-CoV-2

2. Dispense an arbitrary amount* of fresh blood (unfrozen heparin blood within 24 hours of collection or other sample brought to room temperature into the plate prepared in step 1, and mix by pipetting.

* Recommended amounts.

- Fresh blood : 50 - 120 μ L / well
- PBMC / Spleen crushing solution : 0.25 - 1.0 $\times$ 10⁶ cells /well

When using Antigen-Coated Plate for SARS-CoV-2, the peptide concentration in the reaction solution can be adjusted to 1 μ g/mL by adding 100 μ L/well of sample.

3. Incubate at 37°C for 4 hours.
4. Perform Part. A or freeze samples at -80°C after antigen stimulation.

Table 1. Selection of Positive Controls and Target Genes

Positive control antigen		PMA/IM	PHA	LPS	ConA	CEF	Cutoff of Ct
Species / Genes							
Human	<i>IFNG</i>	+++	++	+++	++	+	32 >
	<i>IL2</i>	+++	++	+/-	+/-	N.D.	34 >
	<i>TNFSF2</i>	++	+	++	+	+/-	32 >
	<i>IL4</i>	+++	++	N.D.	N.D.	N.D.	34 >
	<i>IL5</i>	++	+/-	N.D.	N.D.	N.D.	34 >
	<i>IL6</i>	++	++	+++	++	N.D.	34 >
	<i>IL10</i>	++	+	++	+/-	N.D.	34 >
	<i>IL13</i>	+++	++	+/-	+/-	N.D.	34 >
	<i>CSF2</i>	+++	++	++	++	N.D.	32 >
	<i>CXCL10</i>	N.D.	++	++	++	++	32 >
Mouse	<i>IFNG</i>	+++	+/-	+/-	++	—	—
	<i>IL10</i>	+++	++	N.D.	++	—	—
	<i>IL17</i>	++	N.D.	+/-	N.D.	—	—
Final conc. of each positive control		PMA: 100 ng/mL IM: 1000 ng/mL	10-100 µg/mL	1-100 µg/mL	100 µg/mL	1-10 µg/mL	Instrument: ABI Fast7500 Threshold line: 0.1

Human: 100 µL of fresh blood was mixed with each antigen and incubated for 4hr under 37°C.

Mouse: 10⁶ cells of spleen was mixed with each antigen and incubated for 4hr under 37°C.

Abbreviation		Rank	Mean relative mRNA expression (log ₂ FC, n=12)
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate	+++	> 8
IM	Ionomycin	++	5-8
PHA	Phytohemagglutinin	+	3-5
LPS	Lipopolysaccharide	+/-	1.5-3
ConA	Concanavalin A	N.D.	1.5 >
CEF	CEF control peptide pool	—	Not evaluated

5. Part A: LeukoComplete™ Plate and RT Kit

Please refer to the components in the LeukoComplete™ Plate and RT Kit listed under Kit Contents.

➤ Leukocyte Isolation

1. Place the Leukocyte Isolation Plate (Filter plate) on the top of the Deep Well Plate (see Figure 2).
2. Add 150 µL/well of cold PT Buffer to the Filter Plate.
3. Centrifuge at 2,500 g for 1 min at 4°C.
4. Add the sample* to the Filter plate**.
 - * If samples are stored frozen, incubate at room temperature for 30 min to dissolve.
 - ** Sample volume should be less than 200 µL.
5. Incubate at 2 - 8°C for 10 min.
6. Centrifuge at 2,500 g for 2 min at 4°C.
7. Remove the Deep well Plate and place the mRNA Capture Plate under the Filter Plate (see Figure 2).

➤ Cell Lysis and mRNA Isolation

8. Prepare the working lysis solution* by mixing Proteinase K, TCEP, and Lysis Buffer** (see Table 2).
 - * Prepare more working lysis solution than the number of samples required.
 - ** If Lysis Buffer have crystallization, warm up at 37°C for a couple of hours to dissolve the crystallization.
9. Add 60 µL/well of working lysis solution to the Filter Plate and cover with lid.
10. Incubate at 37°C for 10 min.
11. Centrifuge at 2,500 g for 5 min at 4°C.
12. Remove the Filter Plate and cover the mRNA Capture Plate with lid.
13. Incubate the mRNA Capture Plate with lid at room temperature for at least 1 hour.
14. Place the mRNA Capture Plate, Wash Buffer A* and Wash Buffer B on ice pan filled with ice**.
 - * If Wash Buffer A have crystallization, warm up at 37°C for a couple of hours to dissolve the crystallization.
 - ** Keep the plate and Wash Buffer cold during the washing process from 14 to 17.
15. Aspirate the lysates in the mRNA Capture Plate.
16. Add 100 µL/well of Wash Buffer A (cold) and aspirate. Repeat two more times (total of three times).
17. Add 150 µL/well of Wash Buffer B (cold), incubate for 3 min with a lid then aspirate. Repeat two more times (total of three times).
18. Remove any remaining liquid in the wells by tapping the plate face down several times on lint-free cloth.

➤ Synthesis of cDNA

19. Prepare the required amount* of working RT solution by mixing M-MLV Reverse Transcriptase (M-MLV RT), RNase Inhibitor, and RT Buffer (see Table 3).

* Prepare more working RT solution than the number of samples required.

20. Add 30 µL/well of working RT solution to the mRNA Capture Plate and seal with Aluminum Seal.

21. Centrifuge at 2,500 g for 1 min at room temperature.

22. Incubate at 37°C for 30 min.

23. Centrifuge at 2,500 g for 1 min at room temperature.

24. Perform Part B or store the mRNA Capture Plate containing cDNA template at -20 - -80°C.

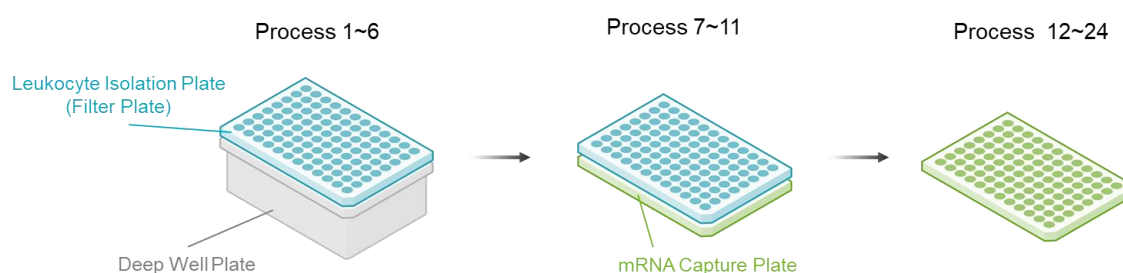


Figure 2. Placement of each plate

Table 2. Preparation of working lysis solution

Component	per well	e.g. 1 plate (100 well)
Proteinase K	0.3 µL	30 µL
TCEP	3.0 µL	300 µL
Lysis Buffer	56.7 µL	5670 µL
Working lysis solution	60 µL	6000 µL

Table 3. Preparation of working RT solution

Component	per well	e.g. 1 plate (100 well)
M-MLV Reverse Transcriptase	0.4 µL	40 µL
RNase Inhibitor	0.1 µL	10 µL
RT Buffer	29.5 µL	2950 µL
Working RT solution	30 µL	3000 µL

6. Part B: LeukoComplete™ Gene Detection Kit

Please refer to the components in the LeukoComplete™ Gene Detection Kit listed under Kit Contents.

➤ Detection of target genes

1. Prepare the required amount* of PCR solution by mixing Primer Mix** and PCR Enzyme Mix (see Table 4).

* Prepare more PCR solution than the number of samples required.

** Primer Mix is different for each control gene and target gene.

Please purchase the Gene Detection Kit for the gene of interest.

2. Apply 6 µL/well* of PCR solution (each gene corresponding well) to the 96-well PCR plate.

* Add the appropriate sample volume for the real-time PCR system to be used.

The total volume for the PCR reaction in this protocol is 10 µL per well.

3. Add 4 µL/well of the cDNA solution from Part A to each corresponding well.
4. Seal the PCR plate with optical film and centrifuge at 2,500 g for 1 min.
5. Set up real-time PCR instrument and run (see Table 5 for PCR parameters).

Table 4. Preparation of PCR solution

Component	per well	e.g. 1 plate (100 well)
Primer Mix	1.0 µL	100 µL
PCR Enzyme Mix	5.0 µL	500 µL
PCR solution	6.0 µL	600 µL

Table 5. Real-time PCR parameters

Fast Mode			Standard Mode		
Stage 1	95°C, 20 sec	1 cycle	Stage 1	95°C, 10 min	1 cycle
Stage 2	95°C, 3 sec 65°C, 30 sec	40 cycles	Stage 2	95°C, 30 sec 65°C, 1 min	40 cycles
Melt curve stage			Melt curve stage		

Equipment: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.)

7. Results analysis

The comparative Ct method* allows relative comparison of target gene expression (see Figure 3).

Please refer to the following to calculate the change in expression of the target gene.

1. Calculate the ΔCt value for each sample.

$$\Delta Ct = Ct [\text{target gene}] - Ct [\text{control gene}]$$

2. Calculate the change in expression of the target gene ($-\Delta\Delta Ct$) from ΔCt of the target sample and blank sample.

$$-\Delta\Delta Ct = \Delta Ct [\text{target gene of target sample}] - \Delta Ct [\text{target gene of blank sample}]$$

3. The change in expression of the target gene is expressed as Log_2FC (Fold Change).

$$-\Delta\Delta Ct = \text{Log}_2FC$$

*Comparative Ct method is a method of showing the expression of target gene relative to endogenous control gene.^[3]

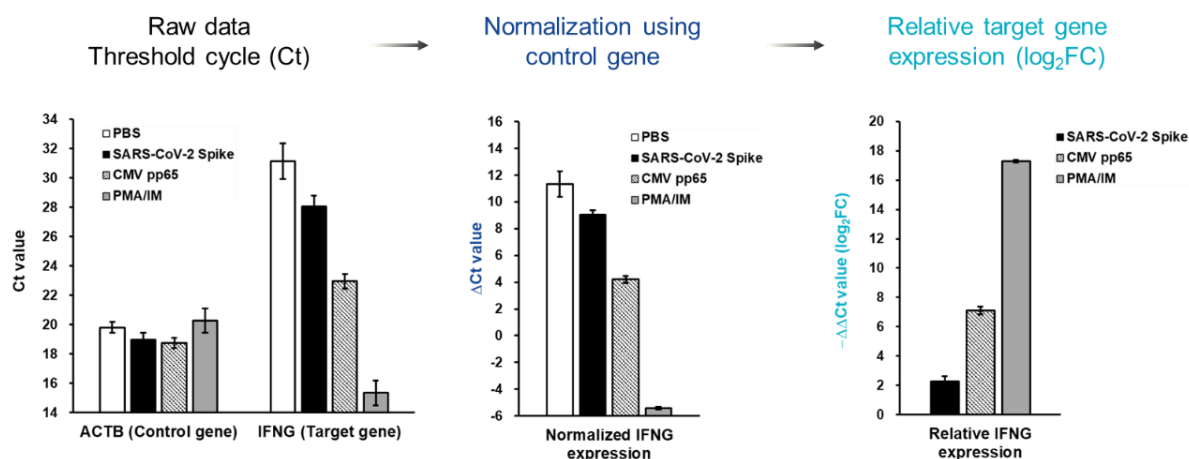


Figure 3. Analysis of comparative Ct method

8. Troubleshooting and Q&A

➤ Troubleshooting

- The target gene cannot be detected.
 - (1) It is possible that the amount of cDNA synthesis has decreased or (2) the expression of the target gene is below limit of detection.
 - In case of (1), we recommend reviewing some of the parameters in the protocol.
 - The sample dissolution time was too long, resulting in mRNA degradation. (5.1)
 - The mRNA was degraded due to insufficient cooling during the washing process. (5.14~5.17)
 - Any liquid remained in the wells and the efficiency of cDNA synthesis decreased. (5.18)
 - In case of (2), the following methods to improve detection sensitivity may be effective.
 - Extend mRNA capture time to 16 hours. (5.13)
 - Increase the amount of cDNA template when performing real-time PCR. (6.3)
 - Perform real-time PCR in Standard mode instead of Fast mode. (6.5)
- The change in expression of the target gene cannot be confirmed.
 - If the positive control is not detected, review the above. If the positive control is detected, it is recommended to review the stimulation conditions (time, concentration, target gene). When using PBMC or spleen crushing solution that has been frozen and stored, it is also effective to perform recovery culture or to add serum components to the stimulation medium components.
- Insufficient amount of cDNA template.
 - Reduce the amount of cDNA template when performing real-time PCR. (6.3)
- Peptide antigens do not dissolve.
 - After dissolving in an organic solvent such as DMSO, dissolve in a buffer such as PBS.
 - However organic solvents such as DMSO may be cytotoxic, so please prepare a final concentration of less than 0.1%.
- Centrifugation at 2,500 g cannot be performed.
 - Centrifugation can be performed at 2,000 g twice.

➤ Q&A

Q1. Can I use animal samples other than Human and Mouse?

A1. cDNA can be obtained from Rat, Rabbit, and Monkey PBMC.

Q2. Is it possible to detect other genes not included in this kit?

A2. This kit purifies mature mRNA with a Poly A tail in leukocytes. In theory, any genes in leukocytes can be detected by designing appropriate primers.

Q3. Do the results correlate with existing cellular immunity assays?

A3. We confirmed correlation of our method with ELISpot, ELISA, and flow cytometry with a correlation coefficient of about 0.5. You can find more details in the references [1] and on the kit website. However, it is necessary to consider that cellular immunity assay may fluctuate in measurement values due to

stimulation conditions, etc.

Q4. Is there an expiration date?

A4. We do not set an expiration date, but please use the product as soon as possible after opening.

9. Precautions

Handling precautions

- The use of heparin blood is recommended in cellular immunity assay.
- PBS, DMSO, or a mixture of the two is recommended as the solvent for the peptide solution. The concentration of DMSO in the sample should be less than 1%.
- Frozen reagents should be mixed well after dissolving and lightly spin down before use.
- Do not allow mRNA Capture Plate to keep for prolonged periods in between steps. Once the protocol has been initiated, proceed continuously to completion.
- Since detection by real-time PCR is extremely sensitive, extreme care should be taken to prevent contamination of the experimental environment and instruments.
- To avoid contamination of sample solutions and reagents, use tips with hydrophobic filters when dispensing sample solutions and reagents.
- Avoid contamination by microorganisms (even small amounts of microorganisms or nucleases contained in human sweat or saliva can degrade RNA and cause false results).
- When handling samples and this kit, wear a mask, gloves, lab coat, and protective eyewear, and take care to avoid contact of the reagents with skin, eyes, and mucous membranes. Wash hands thoroughly after handling.
- When handling the real-time PCR, follow the instruction manual of the respective device.
- When disposing of the container after use, please dispose of it separately as medical waste or industrial waste in accordance with the waste regulations.

Other Notes

- The specifications, design, contents, etc. of this kit are subject to change without notice.
- This kit is for research purposes only and should not be used for commercial, industrial applications, for clinical diagnosis, treatment, and services.
- Do not analyze or reverse engineer this kit.
- All rights (ownership, patents, and other intellectual property right, etc.) related to this kit belong to us.
- We are not responsible for any damages incurred by you or any other third party resulting from this kit.
- The suitability of this kit for any application, including legal compliance, is to be determined by the user.
- If you breach any of your obligations set forth herein, we will demand compensation from

you any damages incurred as a result of or in connection with such breach.

- You represent and warrant that you do not have and will not have any socially reprehensible relationships with antisocial forces, and that you will not act in violation of the laws and regulations of each country and region, including antibribery laws.

10. References

- [1]. Saito, T., et al., Biochem Biophys Res Commun, 2023. 694: p. 149398.
- [2]. Mitsuhashi, M., et al., Clin Chem, 2006. 52(4): p. 634-42.
- [3]. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, Nat Protoc, 2008. 3(6): p. 1101-8.

LeukoComplete™

RUO

Cellular immunity assay kit based on gene detection

- LeukoComplete™ Plate and RT Kit
- LeukoComplete™ Antigen Coated Plate
- LeukoComplete™ Gene Detection Kit

Instruction for Use

はじめに

本キットをご購入いただきましてありがとうございます。

ご使用に際しては、本取扱説明書に記載の方法を推奨しております。

なお、**本製品は研究用試薬**であり、その他の目的には使用できません。

LeukoComplete™について

本キットは、白血球を含む試料から、T 細胞をはじめとする免疫細胞由来の遺伝子を調製するためのキットです。本キットにより、試料中の白血球からの mRNA の簡便な抽出と精製、精製 mRNA の逆転写反応による cDNA の合成が可能となり、合成した cDNA は、定量 PCR 等により、相対的な遺伝子発現変動の評価に用いることができます。本キットは遺伝子検出に基づく細胞性免疫検査法である、Ex vivo Activation of Gene in Leukocyte; EAGL 法の実施に適しています^[1]。独自設計の 2 種類のプレート Leukocyte Isolation Plate と mRNA Capture Plate により、高い再現性とスループットを実現します^[2]。

特徴

- 新鮮血のまま少量・短時間の抗原刺激で免疫応答の検出が可能
- 1 日あたり 100 サンプル以上の処理が可能
- 遺伝子増幅による高感度・網羅的な免疫応答の評価が可能

目次

1. キット構成	3
2. 機器及び器具類	4
3. プロトコルの概要	5
4. サンプルの準備、抗原刺激の方法の例	6
5. Part A: LeukoComplete™ Plate and RT Kit の使用方法	8
6. Part B: LeukoComplete™ Gene Detection Kit の使用方法	10
7. 結果の解析方法	11
8. トラブルシューティングと Q & A	12
9. 注意事項	13
10. 参考文献	14
11. お問い合わせ先	14

1. キット構成

● LeukoComplete™ Plate and RT Kit

構成品	容量	保管温度
PT Buffer	15 mL × 1 本	2 ~ 30 °C
Leukocyte Isolation Plate (Filter Plate)	1 枚	2 ~ 30 °C
Deep Well Plate	1 枚	2 ~ 30 °C
Proteinase K	30 µL × 1 本	2 ~ 30 °C
TCEP	300 µL × 1 本	2 ~ 30 °C
Lysis Buffer	6 mL × 1 本	2 ~ 30 °C
mRNA Capture Plate	1 枚	2 ~ 30 °C
Wash Buffer A	30 mL × 1 本	2 ~ 30 °C
Wash Buffer B	50 mL × 1 本	2 ~ 30 °C
Aluminum Seal	1 枚	2 ~ 30 °C
M-MLV Reverse Transcriptase	40 µL × 1 本	≤ -20 °C
RNase Inhibitor	10 µL × 1 本	≤ -20 °C
RT Buffer	1.5 mL × 2 本	≤ -20 °C

● LeukoComplete™ Antigen Coated Plate

構成品	容量	保管温度
Antigen Coated Plate for SARS-CoV-2*	1 枚 (24 test 分)	2 ~ 30 °C

* 抗原として、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質由来のオーバーラップペプチド (15 アミノ酸、11 オーバーラップ) が塗布されています。ブランク、抗原 2 種、ポジティブコントロールの 4 ウェルで 1 テストとなります。

● LeukoComplete™ Gene Detection Kit

構成品	容量	保管温度
Primer Mix*	100 µL × 1 本	≤ -20 °C
PCR Enzyme Mix	500 µL × 1 本	≤ -20 °C

* 目的の遺伝子ごとに品番及び含まれる Primer Mix が異なります。

2. 機器及び器具類

- 機器

- プレート用スイングローター式遠心機 □ インキュベーター
- リアルタイム PCR 装置
(Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) 等)

- 器具

- アイスパン □ 8 チャンネルマイクロピペット □ 疎水性フィルター付きチップ □ リザーバー
- 96 ウェル細胞培養用プレート
(セルカルチャープレート マルチウェルプレート・U 底フタ付き 96 ウェル (Corning 社) 等)
- リアルタイム PCR 用プレート □ 8 チャンネルアスピレーター (推奨)

3. プロトコルの概要

LeukoComplete™は、白血球由来の mRNA の抽出/精製/逆転写を行う工程 (Part A: Plate and RT Kit を使用) と、任意の遺伝子を検出する工程 (Part B: Gene Detection Kit を使用) に分けられます。

● サンプル準備

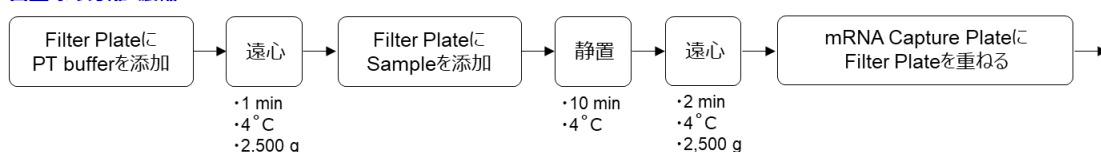
対象サンプル (※):

新鮮血 (ヒト、マウス)、PBMC (ヒト、マウス)、脾臓破砕液 (マウス)

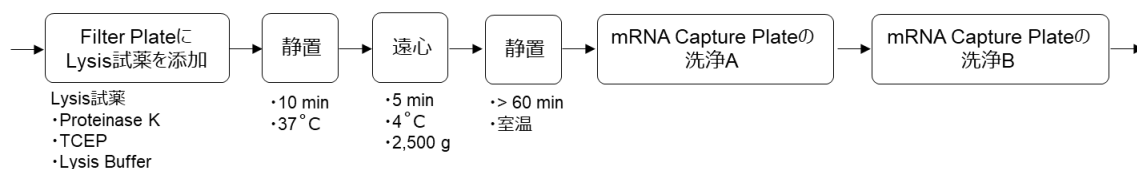
※お客様でご準備いただきます。目的に応じた抗原等を用いて刺激を行って下さい。SARS-CoV-2 の抗原が塗布された抗原刺激プレートはオプション品となります。

● Part A: LeukoComplete™ Plate and RT Kit

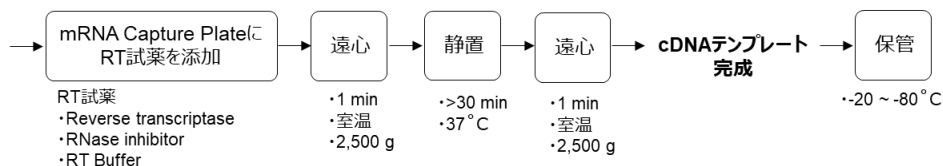
➢ 白血球の分離・濃縮



➢ 白血球由来 mRNA 抽出・精製



➢ cDNA の合成



● Part B: LeukoComplete™ Gene Detection Kit

➢ 対象遺伝子の検出



● 結果解析

・各工程の所要時間の目安は以下をご参照下さい。

Part A: 180 min

Part B: 60 min/run (gene)

4. サンプルの準備、抗原刺激の方法の例

➤ 対象サンプル

- 全血* : ヒト、マウス
- 末梢血単核球（PBMC） : ヒト、マウス
- 脾臓破碎液 : マウス

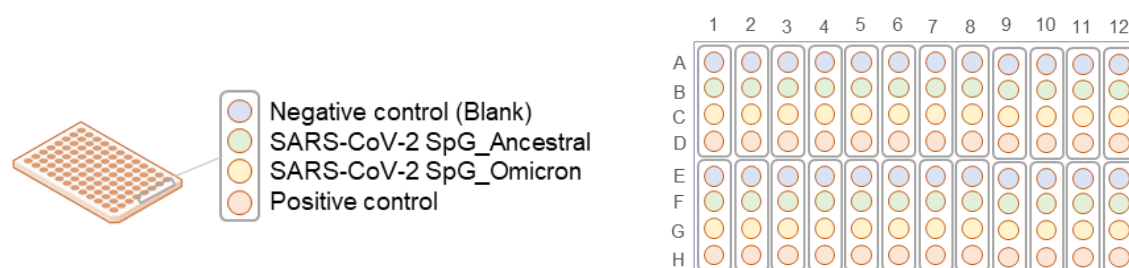
* 免疫応答を評価する場合は、ヘパリン採血管に採血したヘパリン血をご使用下さい。

➤ 抗原刺激の方法

免疫応答の評価を行う際は、刺激条件（時間・濃度・対象遺伝子）をあらかじめご検討下さい。

1. 任意の濃度に溶解した抗原溶液及びブランク、ポジティブコントロール（表 1 を参照）を、96 ウェル細胞培養プレートに分注する。

（Antigen-Coated Plate for SARS-CoV-2 を代わりにご使用いただけます。）



2. 室温に戻した新鮮血（採血後 24 時間以内で凍結していないヘパリン血）等のサンプルを、1. で調製したプレートに任意の量*分注し、ピペッティングにより混合する。

*推奨量を以下に記載する。

- 新鮮血 : 50~120 μL / well
- PBMC/脾臓破碎液 : $0.25\sim1.0\times10^6$ cells /well

Antigen Coated Plate を使用する場合、サンプルを 100 μL /well 添加することで、反応液中のペプチド濃度を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整できます。

3. 37 °C で 4 時間静置する。
4. Part. A の実施、または -80 °C で抗原刺激後のサンプルを凍結保管する。

表 1 ポジティブコントロールと目的遺伝子の選択

Positive control antigen		PMA/IM	PHA	LPS	ConA	CEF	Cutoff of Ct
Species / Genes							
Human	<i>IFNG</i>	+++	++	+++	++	+	32 >
	<i>IL2</i>	+++	++	+/-	+/-	N.D.	34 >
	<i>TNFSF2</i>	++	+	++	+	+/-	32 >
	<i>IL4</i>	+++	++	N.D.	N.D.	N.D.	34 >
	<i>IL5</i>	++	+/-	N.D.	N.D.	N.D.	34 >
	<i>IL6</i>	++	++	+++	++	N.D.	34 >
	<i>IL10</i>	++	+	++	+/-	N.D.	34 >
	<i>IL13</i>	+++	++	+/-	+/-	N.D.	34 >
	<i>CSF2</i>	+++	++	++	++	N.D.	32 >
	<i>CXCL10</i>	N.D.	++	++	++	++	32 >
Mouse	<i>IFNG</i>	+++	+/-	+/-	++	—	—
	<i>IL10</i>	+++	++	N.D.	++	—	—
	<i>IL17</i>	++	N.D.	+/-	N.D.	—	—
Final conc. of each positive control		PMA: 100 ng/mL IM: 1000 ng/mL	10-100 µg/mL	1-100 µg/mL	100 µg/mL	1-10 µg/mL	Instrument: ABI Fast7500 Threshold line: 0.1

Human: 100 µL of fresh blood was mixed with each antigen and incubated for 4hr under 37°C.

Mouse: 10⁶ cells of spleen was mixed with each antigen and incubated for 4hr under 37°C.

Reagent	Abbreviation	Rank	Mean relative mRNA expression (log ₂ FC, n=12)
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate	+++	> 8
IM	Ionomycin	++	5-8
PHA	Phytohemagglutinin	+	3-5
LPS	Lipopolysaccharide	+/-	1.5-3
ConA	Concanavalin A	N.D.	1.5 >
CEF	CEF control peptide pool	—	Not evaluated

5. Part A: LeukoComplete™ Plate and RT Kit の使用方法

キット構成に記載されている LeukoComplete™ Plate and RT Kit 中の構成物をご参照下さい。

➤ 白血球の分離・濃縮

1. Leukocyte Isolation Plate (Filter plate) を Deep Well Plate の上に乗せる (図 1 参照)。
2. 冷えた PT Buffer を Filter plate に 150 µL/well 添加する。
3. 2,500g、4 °C で 1 分間遠心を行う。
4. サンプル*を Filter plate に添加**する。
 - * サンプルを凍結保管した場合は、室温で 30 分間静置し、溶解する。
 - ** サンプルの液量は 200 µL 未満になるように調製下さい。
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。
7. Deep Well Plate を取り除き、Filter Plate を mRNA Capture Plate の上に載せる (図 1 参照)。

➤ 白血球由来 mRNA 抽出・精製

8. Proteinase K、TCEP、Lysis Buffer* を混合し (表 2 参照)、必要量**の Lysis 試薬 を調製する。
 - * Lysis Buffer に白い析出物を認める場合は、37 °C で温め、十分に溶解してから使用する。
 - ** Lysis 試薬 は必要なサンプル数分よりも多めに調製する。
9. Lysis 試薬 を Filter Plate に 60 µL/well 添加し、フタをする。
10. 37 °C で 10 分間静置する。
11. 2,500g、4 °C で 5 分間遠心を行う。
12. Filter plate を取り除き、mRNA Capture Plate にフタをする。
13. mRNA Capture Plate を、室温で 1 時間以上静置する。
14. 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 °C で温め十分に溶解してから使用下さい。
 - ** 14~17 の洗浄工程ではプレートと Wash Buffer は冷たい状態を保って下さい。
15. mRNA Capture Plate の溶解液を吸引する。
16. Wash Buffer A (冷蔵) を 100 µL/well 添加・吸引を 3 回繰り返す。
17. Wash Buffer B (冷蔵) を 150 µL/well 添加・3 分間静置・吸引を 3 回繰り返す。
18. 紙タオル等の上にプレートを逆さにしてたたきつけ、ウェル内の水滴を取り除く。

➤ cDNA の合成

19. M-MLV Reverse Transcriptase (M-MLV RT)、RNase Inhibitor、RT Buffer を混合し (表 3 参照)、必要量*の RT 試薬 を調製する。
 - * RT 試薬 は必要なサンプル数分よりも多めに調製して下さい。
20. RT 試薬 を mRNA Capture Plate に 30 µL/well 添加し、Aluminum Seal でシールする。
21. 2,500g、室温で 1 分間遠心を行う。

22. 37°Cで 30 分間静置する。
23. 2,500g、室温で 1 分間遠心を行う。
24. Part B の実施、または -20~-80°Cで cDNA テンプレートを含む mRNA Capture Plate を保管する。

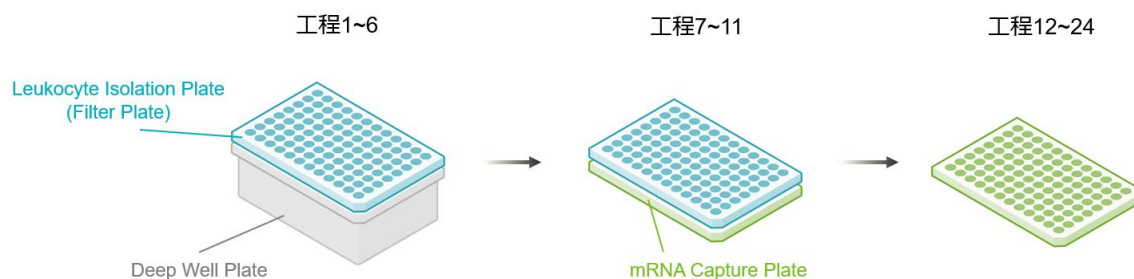


図 1 各プレートの配置図

表 2 Lysis 試薬の調製例

構成品	per well	1 plate 分の調製液量 (≒ 100 sample)
Proteinase K	0.3 μL	30 μL
TCEP	3.0 μL	300 μL
Lysis Buffer	56.7 μL	5670 μL
Lysis 試薬	60 μL	6000 μL

表 3 RT 試薬の調製例

構成品	per well	1 plate 分の調製液量 (≒ 100 sample)
M-MLV RT	0.4 μL	40 μL
RNase Inhibitor	0.1 μL	10 μL
RT Buffer	29.5 μL	2950 μL
RT 試薬	30 μL	3000 μL

6. Part B: LeukoComplete™ Gene Detection Kit の使用方法

キット構成に記載されている LeukoComplete™ Gene Detection Kit 中の構成物をご参照下さい。

➤ 目的遺伝子の検出

1. Primer Mix*, PCR Enzyme Mix を混合し（表 4 参照）、必要量**の PCR 試薬を調製する。
 - * Primer Mix はそれぞれのコントロール遺伝子、ターゲット遺伝子で異なります。
目的の遺伝子の Gene Detection Kit をご購入の上、実施して下さい。
 - ** PCR 試薬は必要なサンプル数分よりも多めに調製して下さい。
2. 測定するサンプル数分のウェルに、PCR 試薬を 96 ウェル PCR プレートに 6 μ L/well*添加する。
 - * 使用するリアルタイム PCR 装置に適したサンプル量を選択下さい。
本プロトコルでは 10 μ L スケールを想定しております。
3. Part A で調製した cDNA 溶液*を 4 μ L/well 添加し、ピペッティングにより混合する。
 - * 凍結保管していた場合は、室温で 15 分間静置後に、作業を実施して下さい。
4. プレートにシールを貼り、2,500g、室温で 1 分間遠心を行う。
5. PCR プレートをリアルタイム PCR 装置にセットし、リアルタイム PCR を行う（パラメーターは表 5 参照）。

表 4 PCR 試薬の調製例

構成品	per well	調製液量 (1 plate = 100 sample)
Primer Mix	1.0 μ L	100 μ L
PCR Enzyme Mix	5.0 μ L	500 μ L
PCR 試薬	6.0 μL	600 μL

表 5 リアルタイム PCR の測定パラメーター例

Fast Mode		
Stage 1	95 °C, 20 sec	1 cycle
Stage 2	95 °C, 3 sec	40 cycles
	65 °C, 30 sec	
Melt curve stage		

Standard Mode		
Stage 1	95 °C, 10 min	1 cycle
Stage 2	95 °C, 30 sec	40 cycles
	65 °C, 1 min	
Melt curve stage		

使用機器: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

7. 結果の解析方法

比較 Ct 法*により、ターゲット遺伝子発現の相対比較が可能です（図 2）。下記を参照に、ターゲット遺伝子の発現変化量を算出して下さい。

1. 各サンプルの ΔCt 値を算出する。

$$\Delta Ct = Ct [\text{ターゲット遺伝子}] - Ct [\text{コントロール遺伝子}]$$

2. 目的サンプルとブランクサンプルの ΔCt からターゲット遺伝子の発現変化量（ $-\Delta\Delta Ct$ ）を算出する。

$$-\Delta\Delta Ct = \Delta Ct [\text{ターゲット遺伝子_目的サンプル}] - \Delta Ct [\text{ターゲット遺伝子_ブランクサンプル}]$$

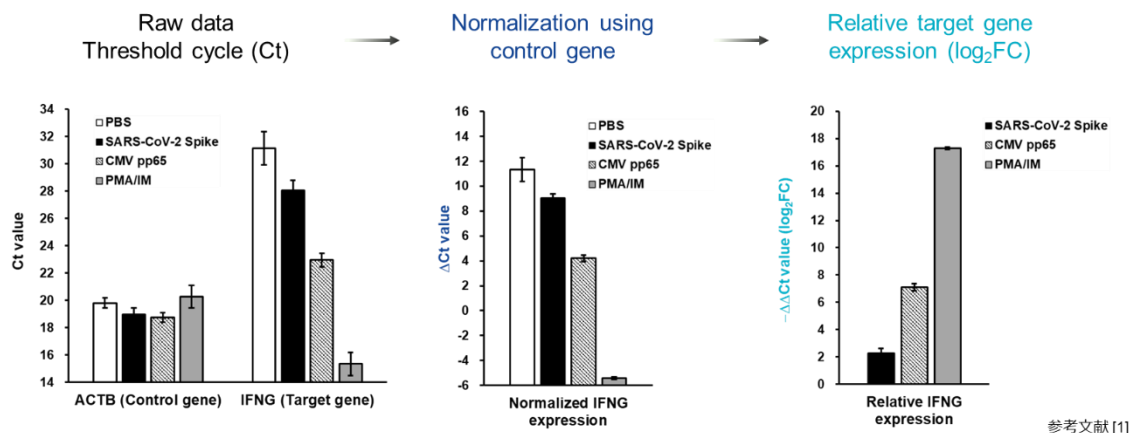
3. ターゲット遺伝子の発現変化量は $\log_2 FC$ （Fold Change）と表される。

$$-\Delta\Delta Ct = \log_2 FC$$

また、ブランクサンプル中の遺伝子や、発現量の少ない遺伝子を対象とする場合、Ct 値が、「表 1 ポジティブコントロールと目的遺伝子の選択（p.5）」に記載の Cutoff of Ct 値を上回る、または検出されない場合がございます。その場合は、Ct 値の上限の数値に変換した上で、上記の解析を実施して下さい。

*比較 Ct 法とは、内在性コントロール遺伝子に対するターゲット遺伝子の相対的な遺伝子発現を示す方法^[3]

図 2 比較 Ct 法の解析例



8. トラブルシューティングと Q & A

➤ トラブルシューティング

- 目的の遺伝子を検出することができない。
 - ①cDNA の合成量が減ってしまったか、あるいは②目的遺伝子の発現量が少ない可能性があります。
 - ①の場合、プロトコルの一部の工程を見直すことを推奨いたします。
 - ・ サンプル溶解時間が長いことで、mRNA が分解してしまった。（5.1）
 - ・ 洗浄工程で十分冷却できていないことで、mRNA が分解してしまった。（5.14~5.17）
 - ・ ウェル中に水滴が残り、cDNA の合成効率が落ちてしまった。（5.18）
 - ②の場合、以下の検出感度を向上させる方法が有効な場合があります。
 - ・ mRNA の捕捉時間を 16 時間に伸ばす。（5.13）
 - ・ リアルタイム PCR を実施する際のテンプレートの量を増やす。（6.3）
 - ・ リアルタイム PCR を Standard mode で実施する。（6.5）
- 目的遺伝子の発現変動が確認できない。

ポジティブコントロールがワークしていない場合は、上記の見直しを行って下さい。ポジティブコントロールがワークしている場合は、刺激条件（時間・濃度・目的遺伝子）を見直すことをお勧めします。また凍結保管していた PBMC や脾臓破砕液を使用する際は、回復培養の実施や刺激の培地成分に血清成分を添加することも有効です。
- cDNA テンプレートの量が足りない。

リアルタイム PCR を実施する際のテンプレートの量を減らす。（6.3）
- ペプチド抗原が溶解しない。

DMSO 等の有機溶媒に溶解後に、PBS などのバッファーに溶解して下さい。

ただし、DMSO 等の有機溶媒は、細胞毒性を示す場合があるので、終濃度 0.1%未満になるように調製下さい。
- 2,500g での遠心が実施できない。

2,000g で、標記の 2 倍の時間で遠心を行うことが可能です。

➤ Q & A

Q1. ヒト、マウス以外の動物検体は使用可能か？

A1. ラット、ウサギ、サルの PBMC から cDNA を得ることができます。別途お問い合わせ下さい。

Q2. キットに含まれない他の遺伝子の検出は可能か？

A2. 本キットでは、白血球中の Poly A テールを有す成熟 mRNA を精製しています。白血球中に発現が確認できる遺伝子であれば、プライマーをご準備いただくことで、検出可能です。別途お問い合わせ下さい。

Q3. 既存の細胞性免疫検査と結果が相関するか？

A3. ELISpot や ELISA、フローサイトメトリーを使用した方法と、相関係数 0.5 程度で相関しました。

参考文献 [1]やキット HP で詳細を確認することができます。ただし、細胞性免疫検査は、刺激条件等で測定値が変動することを考慮する必要があります。

Q4. 使用期限があるか？

A4. 使用期限は設定しておりませんが、開封後はお早めにご使用下さい。

9. 注意事項

取り扱い上の注意事項

- 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、試料中の DMSO 濃度は 1%以下になるように調製して下さい。
- 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を心がけて下さい。
- 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ズブルゴム手袋（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。

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、治療及び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、弊社はご利用者様に対し、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。

10. 参考文献

- [1]. Saito, T., et al., Biochem Biophys Res Commun, 2023. 694: p. 149398.
- [2]. Mitsuhashi, M., et al., Clin Chem, 2006. 52(4): p. 634-42.
- [3]. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, Nat Protoc, 2008. 3(6): p. 1101-8.

11. お問い合わせ先

ご不明な点や、キットへの要望に関しては、以下の問い合わせ先にご連絡下さい。

お問い合わせ先

キヤノンメディカルダイアグノスティックス株式会社 研究開発本部 細胞性免疫検査担当

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