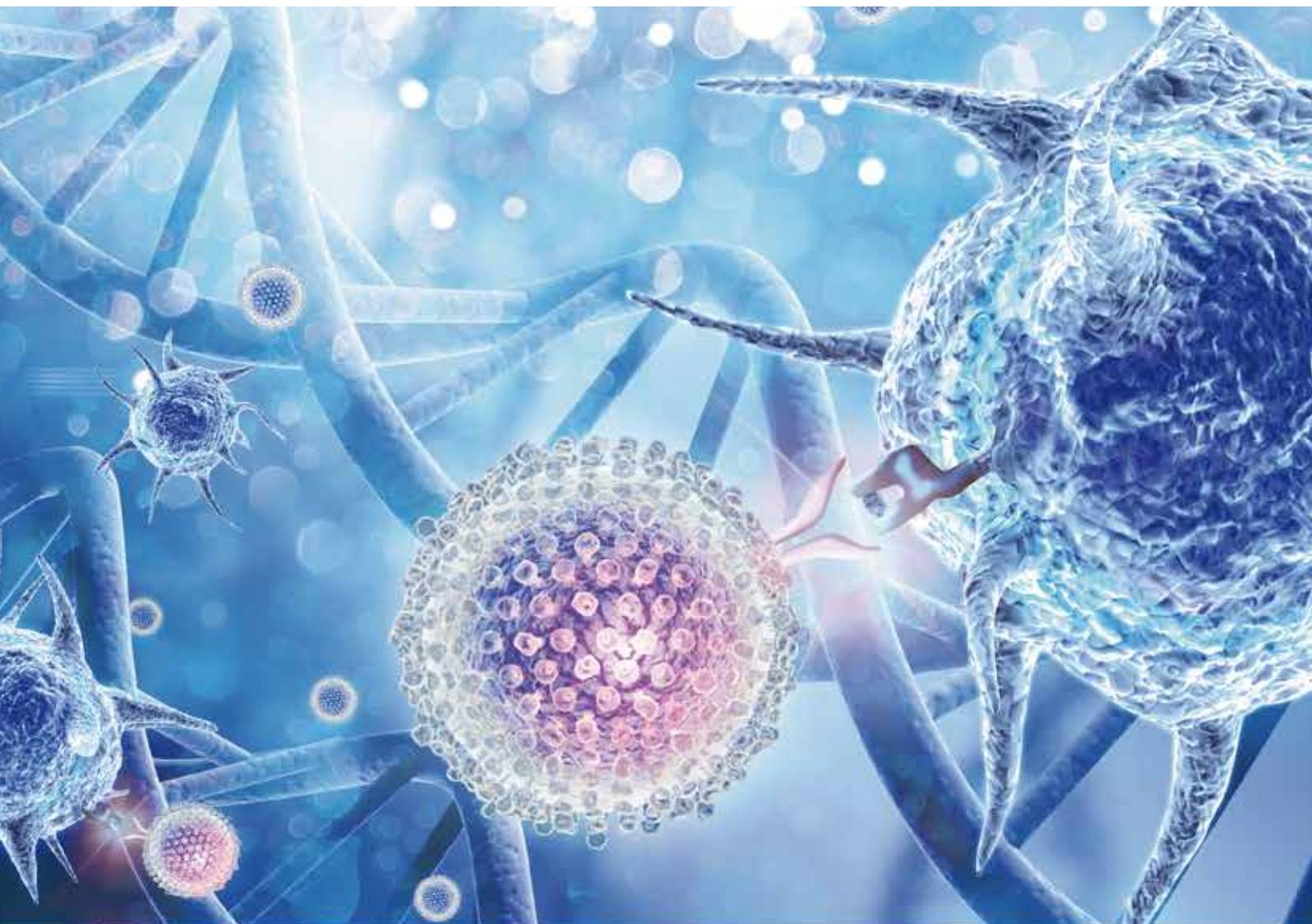


# LeukoComplete™

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



**For cellular immunity assay based  
on mRNA detection (EAGL assay)**



For Research Use Only

キヤノンメディカルダイアグノスティック株式会社

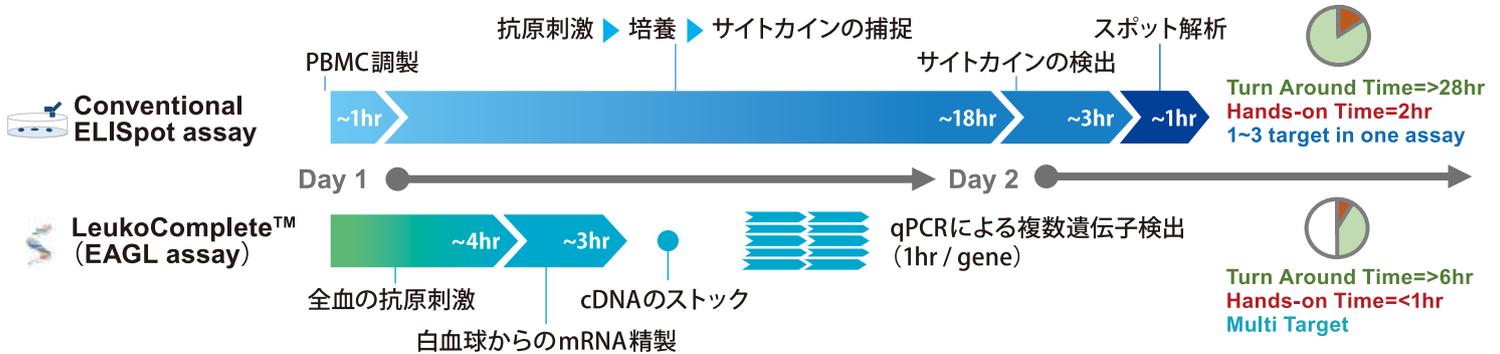


人と科学のステキな未来へ  
コスモ・バイオ株式会社

## 遺伝子発現により細胞性免疫を評価する

細胞性免疫検査では、一般的に、膜状にサイトカインを捕捉し検出するELISpot法や、細胞種を同定するフローサイトメトリーを用いた細胞内染色法などが行われます。前記の方法は、タンパク質検出に基づくため、検出に必要な量のサイトカインの分泌には、一定の培養時間やサンプル量が必要になります。またタンパク質検出には抗体が必要になるため、標的に制限が生じます。

一方、遺伝子検出に基づく場合、発現変動が迅速なため、検査時間の短縮や、PCRを原理とした遺伝子増幅による高感度化、サンプル量の低減、さらにトランスクリプトーム解析による標的遺伝子の拡張などが期待できます。



## 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検出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。種々のサイトカイン遺伝子を検出することで、様々な免疫応答の評価が可能です。

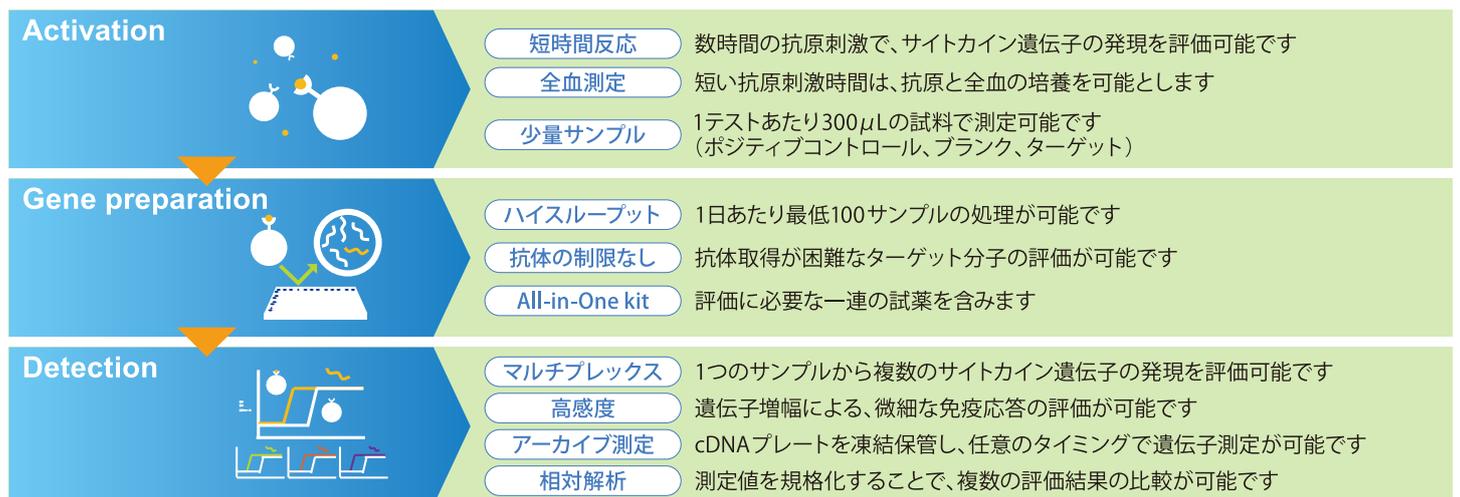
本キットは遺伝子検出に基づく細胞性免疫検査法として報告された、EAGL法 (Ex vivo Activation of Gene in Leukocyte) の実施に適しています [1]。独自設計の2種類のプレート Leukocyte Isolation Plate と mRNA Capture Plate により、高い再現性とスループットを実現します [2]。

本キットは、T細胞抗原のスクリーニング、ワクチンの有効性確認、アレルギー反応の評価等への活用が期待できます。

### 仕様

|        |  |
|--------|--|
| 使用用途   | <ul style="list-style-type: none"> <li>細胞性免疫応答の評価</li> <li>サイトカイン関連遺伝子の検出</li> </ul>   |
| 作業時間   | <ul style="list-style-type: none"> <li>180分+抗原刺激時間</li> </ul>  |
| 対象サンプル | <ul style="list-style-type: none"> <li>新鮮血(ヒト、マウス)</li> <li>PBMC(ヒト、マウス)</li> <li>脾臓(マウス)</li> </ul>   |
| 最終産物   | cDNA 30 $\mu$ L  |
| 検出対象   | <ul style="list-style-type: none"> <li><b>コントロール遺伝子(ヒト、マウス)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>ACTB, GAPDH, B2M</li> </ul> </li> <li><b>ターゲット遺伝子(ヒト)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>IFNG, IL2, TNFSF2, IL6, IL10, IL13, CSF2, CXCL9, CXCL10, IL4, IL5</li> </ul> </li> <li><b>ターゲット遺伝子(マウス)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>IFNG, IL10, IL17</li> </ul> </li> </ul> |
| 測定機器   | <ul style="list-style-type: none"> <li>リアルタイムPCR装置</li> <li>デジタルPCR装置</li> </ul>   |

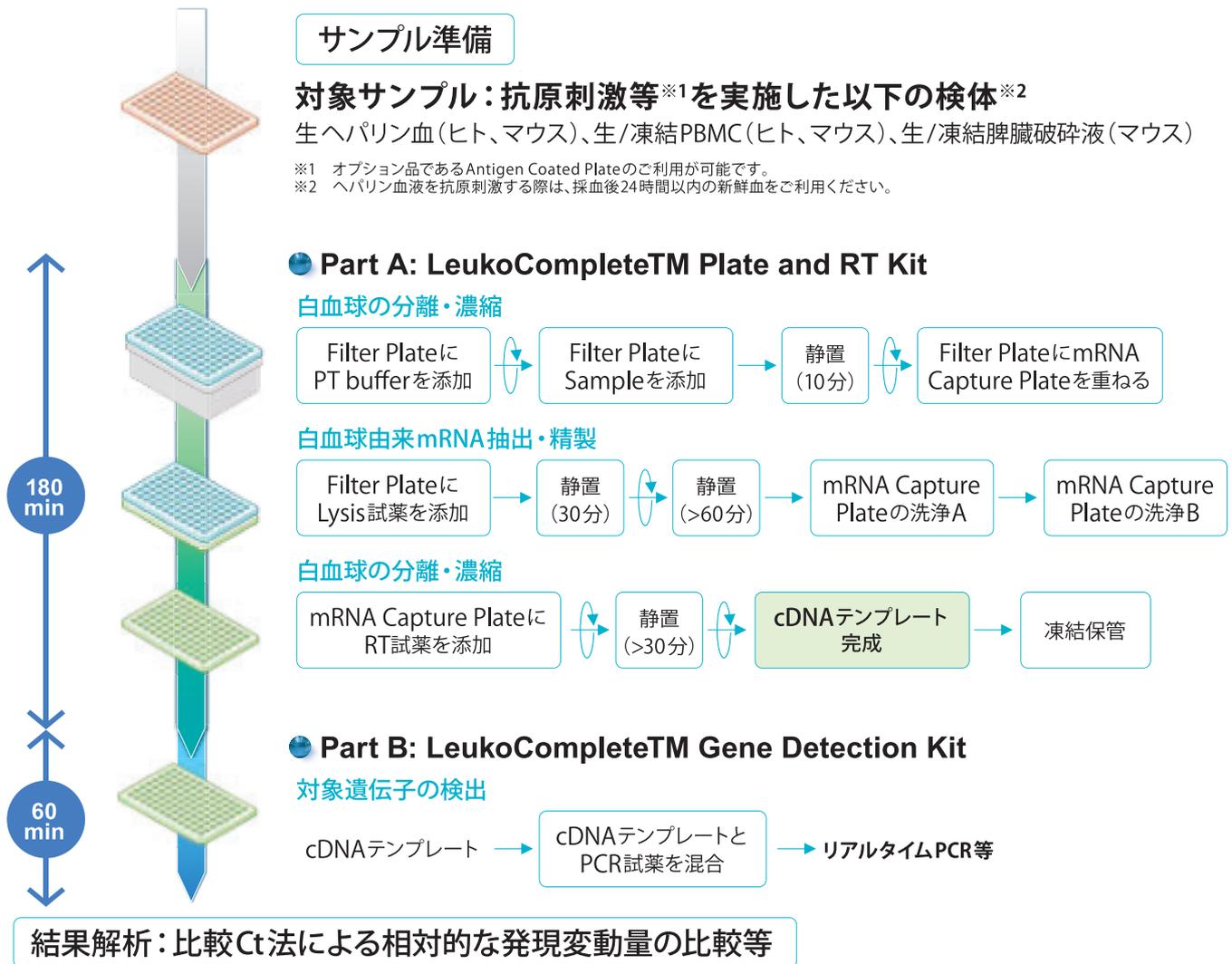
## LeukoComplete™を用いた遺伝子検出による細胞性免疫検査の特徴



# LeukoComplete™の使用法

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。

## ■ キットのプロトコル概要



## ■ 対象遺伝子と抗原刺激方法の例

ヒト由来のサンプルを種々のポジティブコントロールにより刺激した際の遺伝子応答を示す<sup>※3</sup>

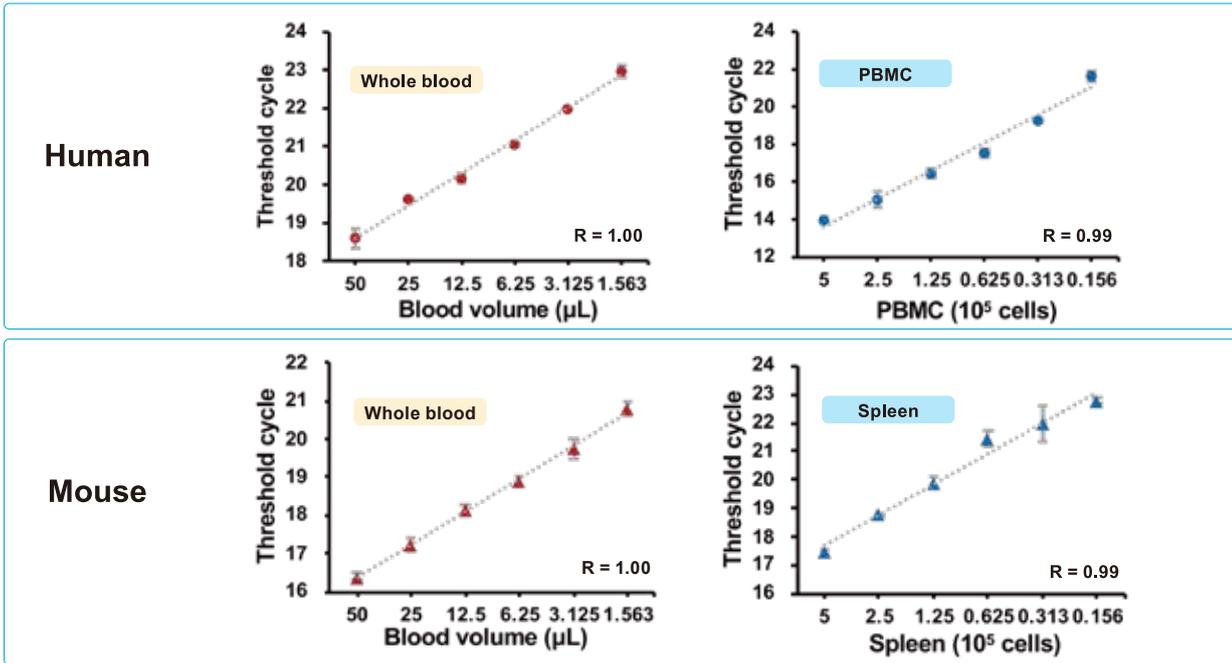
| Gene   | Antigen |     |      |      |      | Rank | Mean Relative mRNA expression (log2FC) |
|--------|---------|-----|------|------|------|------|--|
|        | PMA/IM  | PHA | LPS  | ConA | CEF  |      |  |
| IFNG   | +++     | ++  | +++  | +    | +    | +++  | > 8                                    |
| IL2    | +++     | ++  | +    | N.D. | +/-  | ++   | 6~8                                    |
| TNFSF2 | ++      | +   | ++   | +/-  | +/-  | +    | 4~6                                    |
| IL4    | +++     | ++  | +/-  | N.D. | N.D. | +/-  | 2~4                                    |
| IL5    | ++      | +   | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 2 >                                    |
| IL6    | ++      | +++ | +++  | ++   | N.D. | -    | Not evaluated                          |
| IL10   | +       | +   | ++   | +/-  | +/-  |      |  |
| IL13   | +++     | ++  | +    | N.D. | N.D. |      |  |
| CSF2   | +++     | ++  | ++   | +    | +/-  |      |  |
| CXCL10 | N.D.    | ++  | ++   | ++   | ++   |      |  |

Abbreviation:  
 PMA; Phorbol 12-myristate 13-acetate,  
 IM; Ionomycin,  
 PHA; Phytohemagglutinin,  
 ConA; Concanavalin A  
 CEF; CEF control peptide pool,

※3 その他の動物種や詳細についてはキットのHPを参照ください

# LeukoComplete™の性能評価

## 遺伝子の抽出/精製性能 ヒト血液、PBMC、マウス血液、脾臓の添加量とコントロール遺伝子の発現量

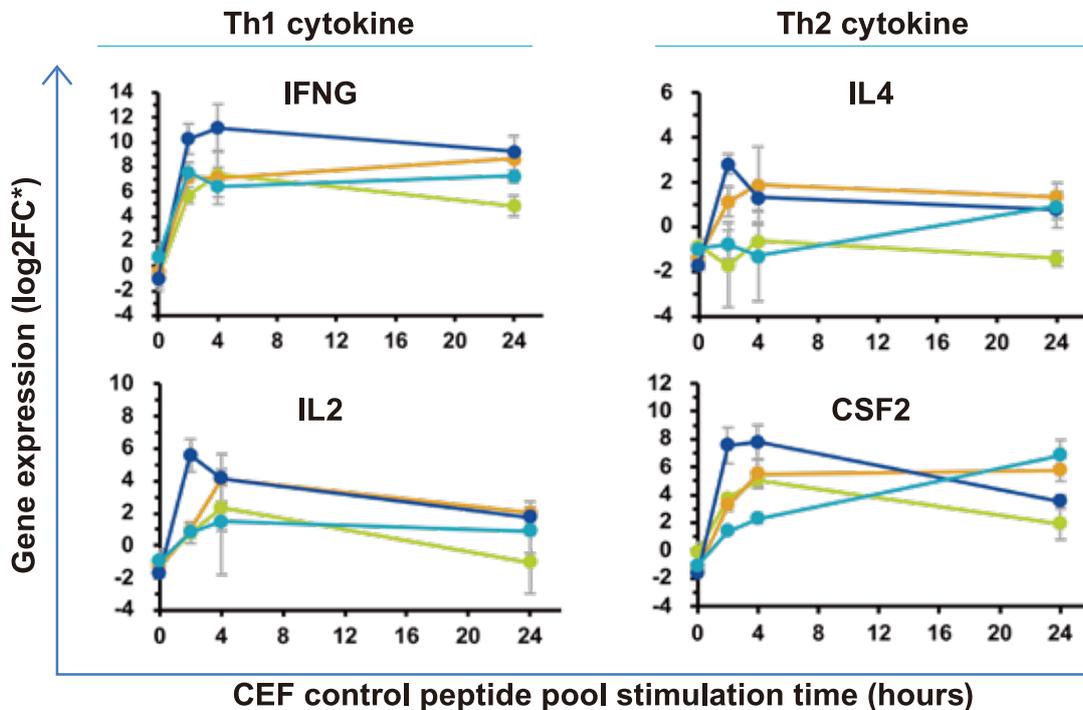


ヒト血液、マウス血液を50 mL、ヒトPBMC、マウス脾臓を5×10<sup>5</sup> cellsから2倍ずつ段階希釈を行い、LeukoComplete™を用いて白血球由来のmRNAを抽出/cDNA合成を行い、ハウスキーピング遺伝子を検出した。

### 定量的な遺伝子検出能

いずれのサンプル種を対象にした場合も、高い直線性 (R > 0.9) を有しながら遺伝子を抽出した。

## ターゲット遺伝子の例 抗原刺激時間に応じた免疫関連遺伝子の発現変動解析



100μLのヒト新鮮血とCEF control peptide\*またはPBSを混合し、37°Cで0~24時間培養後、LeukoComplete™により遺伝子を抽出し、各種遺伝子の発現変動を算出した。(n=4例) \*サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス、インフルエンザウイルス由来のペプチドプール

### 短時間の抗原刺激で サイトカイン遺伝子発現の変化を検出

いずれの遺伝子を検出対象とした場合も、2~4時間で発現変動がピークに達した\*。  
\*IL4では、誤差内 (log2FC=0±1) の変動に留まる症例が存在した。)

\*log2FC = (ターゲット遺伝子のCt値 [抗原刺激あり] - コントロール遺伝子のCt値 [抗原刺激あり]) - (ターゲット遺伝子のCt値 [抗原刺激なし] - コントロール遺伝子のCt値 [抗原刺激なし])

# LeukoComplete™のアプリケーション例

## 遺伝子検出に基づく細胞性免疫検査によるCOVID-19ワクチンの評価

### 評価のためのT細胞抗原スクリーニング

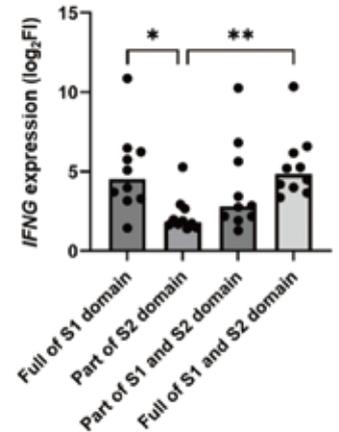
COVID-19mRNAワクチン接種者(n=10)の新鮮血を用いて、ワクチンの基となったSARS-CoV-2 Spike-glycoprotein (SpG) に対する細胞性免疫応答を評価した。抗原には、SpGの各パート由来のオーバーラップペプチド(15 mer, 11 overlap)を用いた。

#### 抗原に応じた細胞性免疫活性を検出した

オーバーラップペプチドの基となったパート依存的に、IFNG発現が変化した。

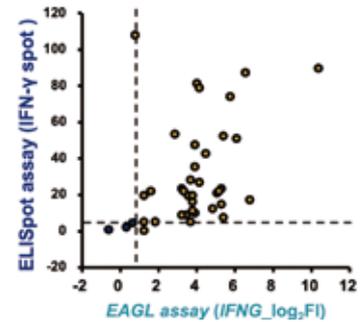
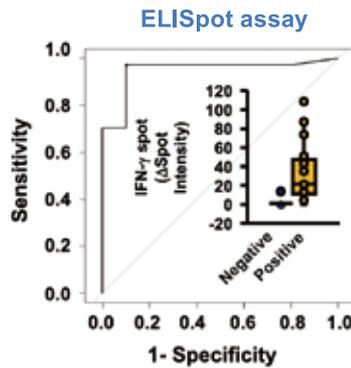
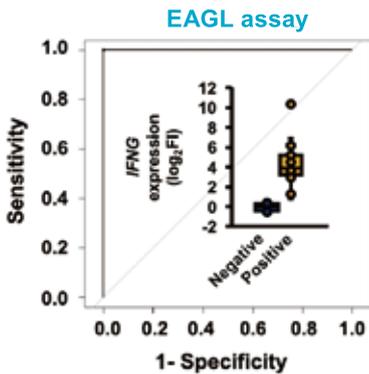
#### ワクチン接種者の検出に適した抗原を同定した

SpGの全長由来のオーバーラップペプチドで、最も多くのワクチン接種者から細胞性免疫活性を検出した。



### ワクチン接種の有無による細胞性免疫活性の比較

SARS-CoV-2の感染歴のないCOVID-19mRNAワクチン接種者(n=37)/未接種者(n=10)間の新鮮血を用いて、SpG全長由来のオーバーラップペプチドに対する細胞性免疫応答を評価した(37°C、4時間抗原刺激→EAGL assay)。同様に、PBMCを用いてELISpotを実施した(37°C、72時間抗原刺激)。



#### ELISpot assayと同等以上の性能を示した

ワクチン接種者の細胞性免疫活性の検出におけるEAGL assayの感度及び特異度はELISpot assayと同等以上だった。

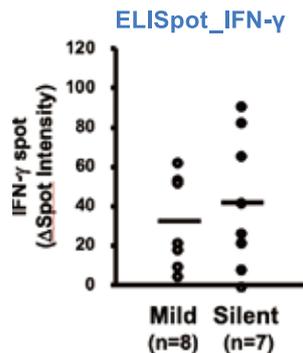
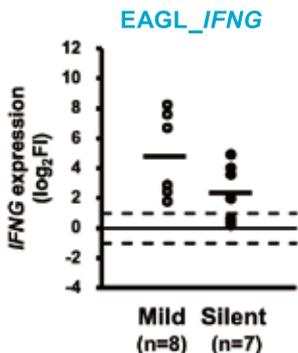
#### ELISpot assayの補完が可能

測定値が相関する傾向にあった。点線はカットオフ。

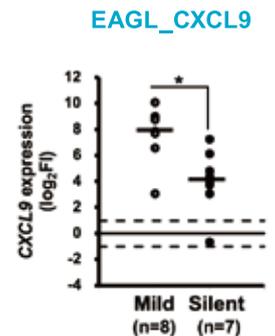
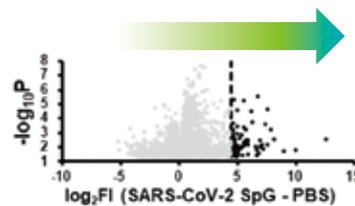
### ワクチンの有効性評価

細胞性免疫活性と感染後の症状の関係

EAGL法によりCOVID-19mRNAワクチン接種者の細胞性免疫活性を追跡調査した。そのうち、ブレイクスルー感染を起こした接種者を対象に、ブレイクスルー感染後の症状とブレイクスルー感染前の細胞性免疫活性の関係を調べた。



#### トランスクリプトーム解析による最適な遺伝子の探索



#### EAGL法で細胞性免疫と症状の関連が見出された

症状なしの方で高い細胞性免疫活性確認された。

#### 優れた検出遺伝子(CXCL9)を見出した

有意差をもって、症状の有無を切り分けた。

## LeukoComplete™ Plate and RT Kit

| 構成                                       | 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™ Gene Detection Kit

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

※1 目的の遺伝子ごとにカタログ番号が異なります。

●ターゲット遺伝子 または ●コントロール遺伝子から、必要なプライマーを含む、キットをご購入ください。

### ●ターゲット遺伝子

| Gene   | Human        | Mouse        |
|--------|--------------|--------------|
| IFNG   | 11150-ht-001 | 11150-mt-001 |
| IL2    | 11150-ht-002 | -            |
| TNFSF2 | 11150-ht-003 | -            |
| IL4    | 11150-ht-004 | -            |
| IL5    | 11150-ht-005 | -            |
| IL6    | 11150-ht-006 | -            |
| IL10   | 11150-ht-007 | 11150-mt-002 |
| IL13   | 11150-ht-008 | -            |
| IL17   | -            | 11150-mt-003 |
| CXCL9  | 11150-ht-009 | -            |
| CXCL10 | 11150-ht-010 | -            |
| CSF2   | 11150-ht-011 | -            |

### ●コントロール遺伝子

| Gene  | Human        | Mouse        |
|-------|--------------|--------------|
| ACTB  | 11150-hc-001 | 11150-mc-001 |
| GAPDH | 11150-hc-002 | 11150-mc-002 |
| B2M   | 11150-hc-003 | 11150-mc-003 |

## ●その他のご案内

### ●キットの使用に際して (以下の機器が必要になります。)

- ・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

### ●キットの参考文献

- [1] Saito,T.,et al.,Biochem Biophys Res Commun,2023.694 : p.1493-98.  
 [2] Mitsuhashi,M.,et al.,Clin Chem,2006.52 (4) : p.634-42.

### ●キットのご購入に際して

本キットは、コスモ・バイオ株式会社のホームページよりご購入いただけます。



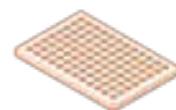
キットHP

キットの詳細については、ホームページを参照ください。

## LeukoComplete™ Antigen Coated Plate

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

※2 SARS-CoV-2スパイクタンパク質のオーバーラップペプチドプール (15 a.a.,11 overlap) に対する評価が可能なプレートです。1test当たり、4well使用します (右図参照)。



- Negative control (Blank)
- SARS-CoV-2 SpG\_Ancestral
- SARS-CoV-2 SpG\_Omicron
- Positive control

## キヤノンメディカルダイアグノスティクス株式会社

研究開発本部 TEL 055-988-6018 (細胞性免疫検査担当窓口)

本キットに関するお問い合わせは上記の窓口、あるいはキットHPから承ります。

RU01-2503

### 取扱店

お願い / 注意事項 記載の社名・商品名等の名称は、弊社または各社の商標または登録商標です。

【希望販売価格】 記載の希望販売価格は2025年4月1日現在の価格で、予告なく改定される場合があります。また、「希望販売価格」「キャンペーン中の参考価格」は参考価格であり、販売店様からの実際の販売価格ではございません。ご注文の際には販売店様へご確認くださいませ。表示価格に消費税は含まれておりません。

【使用範囲】 記載の商品およびサービスは全て、「研究用」です。人や動物の医療用・臨床診断用・食品用等としては使用しないよう、十分ご注意ください。

<https://www.cosmobio.co.jp/>



人と科学のステキな未来へ

# コスモ・バイオ株式会社

— 商品の価格・在庫・納期に関するお問い合わせ —  
 TEL: 03-5632-9630 (受付時間 9:00 ~ 17:30)  
 FAX: 03-5632-9623

— 商品に関するお問い合わせ —  
 TEL: 03-5632-9610 (受付時間 9:00 ~ 17:30)  
 FAX: 03-5632-9619

本社所在地 〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル

14121