

CONTENTS:

EDITORIAL

The race against SARS-CoV-2 variants

PRODUCTS

Anti-Spike detection assays

- ELISA and LIPS
 - RBD-Lucia proteins
- Flow cytometry (FACS)
 - pUNO1-Spike-dfur plasmids
 - Anti-CoV2RBD-cas-mIgG2a
 - Anti-CoV2RBD-imd-mIgG2a
 - Anti-CoV2RBD-bam-mIgG2a
 - Anti-CoV2RBD-ete-mIgG2a

Neutralization Assays

- Spike-pseudotyped lentiviral infection
 - pLV-Spike plasmids
 - A549-hACE2-TMPRSS2 Cells
 - HEK-Blue™ hACE2-TMPRSS2 Cells
- Spike-ACE2 dependent cell fusion
 - pUNO1-Spike plasmids
 - 293-hMyD88 Cells
 - HEK-Blue™ hACE2 Cells
 - A549-Dual™ hACE2-TMPRSS2 Cells

Mycoplasma Detection

- MycoStrip™

InvivoGen

ASIA

Unit 106, Building 15W
15 Science Park West Avenue
Hong Kong Science Park

T: +852 3622 3480
F: +852 3622 3483

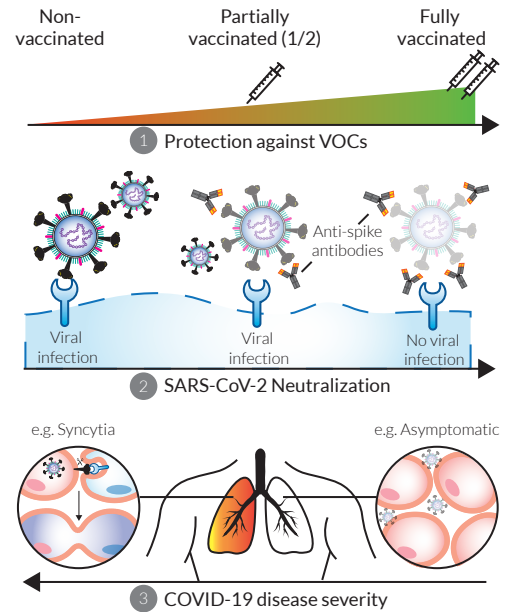
info.hk@invivogen.com
www.invivogen.com

SUMMER 2021

The race against SARS-CoV-2 variants

現在も続いている新型コロナウイルス感染症の世界的流行は、全世界の公衆衛生、経済および社会に破壊的な影響をもたらしています。新型コロナウイルスの拡大を抑えるため、かつてない早さで効果的なワクチンが開発されました。現在、mRNA 型・ウイルスベクター型・タンパク質サブユニット型・および不活化ウイルスベクターワクチンの4種類の新型コロナウイルスワクチンが主流で、使用承認済み、または開発中です¹。世界的なワクチン接種の取り組みの大多数は、ファイザー・ビオンテックおよびモデルナによってそれぞれ開発された mRNA ベースワクチン (BNT162b2 および mRNA-1273)、アストラゼネカおよびジョンソンエンドジョンソン/ヤンセンによりそれぞれ開発されたウイルスベクターベースワクチン (ChAdOx1 nCoV-19 および Ad26.COV2.S) が中心となっています。これらは全て新型コロナウイルスのスパイク (S) タンパク質をコードしており、疾患を防ぐために、S タンパク質をブロックし、ウイルスの侵入を阻害する中和抗体の産生をもたらすことを主目的としています²。これらのワクチンは、世界的な流行の初期に広がっていた新型コロナウイルス野生株由来の S タンパク質を基にデザインされています。しかし、いくつかの懸念される変異株 (VOC)、および注目すべき変異株 (VOI) が出現しています^{2,4}。そのため、次のような疑問が浮かびあがります：これらの変異株は新しく導入されたワクチンの効き目に影響を及ぼすのでしょうか？

現在、懸念される変異株がイギリス (B.1.1.7, アルファ株)、南アフリカ (B.1.351, ベータ株)、ブラジル (P.1, ガンマ株) およびインド (B.1.617.2, デルタ株) で初確認されています。さらに、注目すべき変異株がアメリカ (B.1.429, イプシロン株) および B.1.526, イオタ株) およびインド (B.1.617.1, カッパ株) で初確認されています (表参照)⁴。懸念される変異株および注目すべき変異株は、S タンパク質コード領域における変異および/または欠失で特徴付けられています。これらのいくつかは宿主の受容体 ACE2 への結合を増強することにより伝播性を増強 (例：D614G および N501Y)、および/または中和抗体のエピトープ部分を変えることにより免疫回避を補助しています (例：K417N/T, L452R および E484K/Q)³。多くのこれらの変異は S タンパク質の受容体結合ドメイン (RBD) で見られます。血清抗体の主要な活性は RBD を標的とすることから、新型コロナウイルス感染者の血清学的解析を考えた場合、この点 (RBD 上の変異) は大きな懸念となります⁵。



これまでの研究で、承認されたワクチンは新しく発生した変異株にも有効であることが示されています。しかしその効果は、変異株、ワクチンおよびその人が部分接種 (2 回接種するワクチンのうち 1 回接種) したか、または完全接種 (2 回接種するワクチンのうち 2 回の接種を完了) したかといったいくつかの要因によって変わります⁶。一般に、BNT162b2、mRNA-1273、または ChAdOx1 のワクチン接種を完全に済ませると、これまでに特定されている全ての懸念される変異株により生じる感染症状、入院を必要とする症状に対して高水準の防御効果をもたらします⁸。そのため、新たに発生する変異株と闘うために、現在のワクチンの効果を継続して追跡すること、および変異スパイクに対する追加の接種または適が必要かどうかを決めることが、主要な世界的な健康の優先事項の一つとなっています。

ワクチンは必ずしも感染を防ぐものではなく、それを突破する場合があります^{9,10}。これまでのところ、ウイルス量が多く合併症を引き起こすような深刻な新型コロナウイルス感染症に対して、ワクチンは効果的な対抗策と見られてきました。このような場合、「スパイク依存性細胞融合」として知られる現象が確認されています¹¹。ウイルスと細胞膜の融合を媒介する能力の他、S タンパク質は隣接する細胞の融合も媒介し、多核巨細胞・いわゆる合胞体の形成をもたらします。この現象は、以前のコロナウイルス大流行 (例：SARS および MERS) の慢性的な組織傷害でも生じており、新型コロナウイルス感染重症者の剖検でも頻繁に確認されていました^{11,12}。合胞体形成は新型コロナウイルスの重症化に寄与していると考えられています。しかし、懸念される変異株の病原性を完全に理解するには広範囲の研究が依然として必要です。

新型コロナウイルスへの理解は、世界的な流行を通して驚くべき速度で進んでいます。それでもなお、ワクチンの効果は限定的であり、新型コロナウイルスに対する標的療法開発に向けた至急の研究が世界的に続けられる必要があります。

InvivoGen	PANGO	WHO ⁴
Original	(D614)	-
V1	(G614)	-
V2	B.1.1.7	Alpha
V3	B.1.351	Beta
V4	B.1.429	Epsilon
V5	P.1	Gamma
V6	B.1.526	Iota
V7	B.1.617.1	Kappa
V8	B.1.617.2	Delta

SARS-CoV-2 variant (V) nomenclature

1. Noh, J.Y. et al. 2021. *Signal Transduct Target Ther* 6, 203. doi:10.1038/s41392-021-00623-2. 2. Altmann, D.M. et al. 2021. *Science* 371, 1103-1104. doi:10.1126/science.abg7404. 3. Harvey, W.T. et al. 2021. *Nat Rev Microbiol* 19, 409-424. doi:10.1038/s41579-021-00573-0. 4. WHO, 2021, <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. 5. Piccoli, L. et al. 2020. *Cell* 183, 1024-1042 e1021. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.037. 6. Bian, L. et al. 2021. *Expert Rev Vaccines* 20, 365-373. doi: 10.1080/14760584.2021.1903879. 7. Garcia-Beltran, W.F. et al. 2021. *Cell* 184(9):2372-2383.e9. doi: 10.1016/j.cell.2021.03.013. 8. Nasreen, S. et al. 2021. *medRxiv*. doi: 10.1101/2021.06.28.21259420. 9. Brosh-Nissimov, T. et al. 2021. *Clin Microbiol Infect*. Pre-Proof. doi: 10.1016/j.cmi.2021.06.036. 10. Kustin, T. et al. 2021. *Nat Med*. doi: 10.1038/s41591-021-01413-7. 11. Buchrieser, J. et al. 2020. *EMBO J*, e106267. doi:10.15252/embj.2020106267. 12. Asanow, D. et al. 2021. *Cell* 184, 3192-3204 e3116. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.033.

Antibody responses to SARS-CoV-2 Spike variants

新型コロナウイルスに対する抗体反応への理解は、特に数多くの懸念される変異株の出現により絶えず進展しています。InvivoGen 社は患者やワクチン接種者血清由来、または遺伝子組換え技術により作られた抗スパイク抗体の結合親和性および中和能力を測定する包括的なシリーズのツールを提供しています。

Anti-Spike detection assays

InvivoGen 社は、モノクローナル抗体 (mAbs) および / または血清抗体の新型コロナウイルススパイク変異株に対する結合を研究するツールを取りそろえて提供しています。その中には研究または臨床的に関連するリコンビナント抗スパイクモノクローナル抗体群も含まれています。これらは機能的な評価済みで、スクリーニングアッセイにおける標準またはコントロールとして理想的です。

ELISA and LIPS

InvivoGen 社は、ルシフェラーゼタグ付きのスパイク変異株受容体結合ドメインのコレクション「RBD-Lucia タンパク質」を開発しました。これらは ELISA または LIPS アッセイに使用する抗スパイク抗体の結合親和性評価に使用できます。

• Luciferase-based ELISA

RBD-Lucia タンパク質は一般的に使用されている HRP 検出法よりも広いダイナミックレンジをもつレポーターの Lucia ルシフェラーゼを特徴としています。ELISA に使用した場合、2 時間足らず (実作業時間) で、これらのキメラタンパク質は異なるスパイク変異株に対するモノクローナル抗体の結合親和性比較に使用することができます (Fig. 1a)。

• LIPS

ELISA が固相のアッセイである一方、ルシフェラーゼ免疫沈降システム (LIPS) は液相のアッセイです。この方法では直線および立体のエピトープ双方に対する抗体の検出が可能となります。LIPS を使用することで、RBD-Lucia タンパク質は抗スパイク抗体の試験に使用できます。ELISA に対して、新型コロナウイルス感染症から回復した患者および / またはワクチン接種者の血清中における抗体反応を評価できる能力が主な利点です (Fig. 1b)。



リコンビナントスパイクタンパク質のエンドトキシン汚染は実験上のバイアスをもたらすことが示されています¹。製品の厳格な品質管理の一環として、InvivoGen 社はエンドトキシン汚染が無い事を確認しています。

Flow cytometry (FACS)

InvivoGen 社は宿主細胞 (例: HEK293 細胞) へのトランスフェクションにより、フローサイトメトリーベースの結合試験に使用できる抗スパイクモノクローナル抗体のスクリーニング用に特化してデザインされた、pUNO1-Spike-dfur プラスミドのコレクションを提供しています。

フローサイトメトリーでのスクリーニングアッセイ用に表面への発現を最大限に促進するため、重要な認識残基 (R683A および R685A) の変異により、スパイクのフリント切断部位を不活化しています。

野生株または P.1 変異株のスパイクタンパク質をコードする pUNO1-Spike-dfur プラスミドをトランスフェクションした HEK293 細胞は、リコンビナントモノクローナル抗体の結合親和性をフローサイトメトリーで簡単に評価できました。Fig.2 に見られるように、(a) Anti-CoV2RBD-ete-mIgG2a は P.1 変異株と比較し、野生株のスパイクタンパク質に対してより高い結合親和性を示しました。一方で、(b) Anti-CoV2RBD-bam-mIgG2a は同じ P.1 変異株に対して結合しませんでした。

PRODUCTS	QTY	CAT. CODE
pUNO1-SpikeV'X'-dfur	20 µg	p1-spike-df-v'x'
Anti-CoV2RBD-cas-mIgG2a	100 µg	srbdc3-mab10
Anti-CoV2RBD-imd-mIgG2a	100 µg	srbdc4-mab10
Anti-CoV2RBD-bam-mIgG2a	100 µg	srbdc5-mab10
Anti-CoV2RBD-ete-mIgG2a	100 µg	srbdc6-mab10

'x' refers to the in-house number of the Spike variant (see table on the front page).
More info at: www.invivogen.com/sars2-spike-vectors

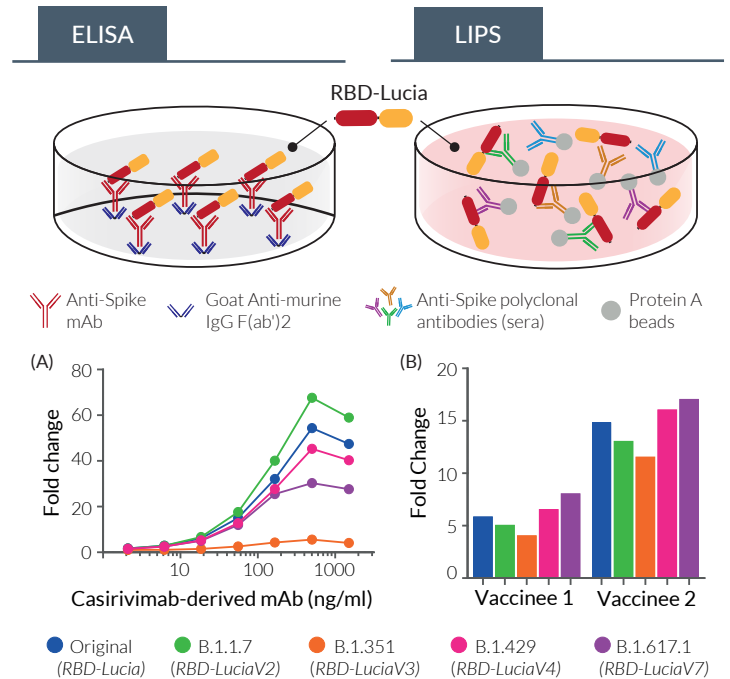


Fig 1: Binding affinity of Anti-Spike antibodies. (A) ELISA was performed by first adding an Anti-mIgG antibody, then Anti-CoV2RBD-cas-mIgG2a (Casirivimab-derived mAb), and lastly RBD-Lucia, RBD-LuciaV2, RBD-LuciaV3, RBD-LuciaV4 or RBD-LuciaV7 protein. (B) LIPS was performed by mixing Protein A beads, a vaccinee serum, and a RBD-Lucia protein (same as (A)). (A+B) Binding affinity was assessed by measuring Lucia activity using QUANTI-Luc™.

PRODUCTS	QTY	CAT. CODE
RBD-LuciaV'X'	20 µg	rbd-lucia-v'x'

'x' refers to the in-house number of the Spike variant (see table on the front page).
More info at: www.invivogen.com/sarscov2-lucia

1. Ouyang, W. et al. 2021. *Int. J. Mol. Sci.* 22(14), 7540. doi: 10.3390/ijms22147540.

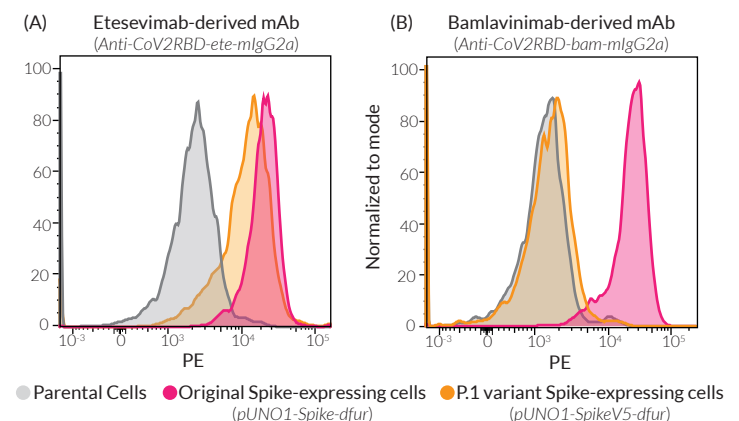


Fig 2: Detection of Spike variants by FACS. 293 parental (grey), 293-SARS2-S-dfur (original; pink), and 293-SARS2-S-dfur-V5 (P.1; orange) cells were incubated with either (A) Anti-CoV2RBD-ete-mIgG2a or (B) Anti-CoV2RBD-bam-mIgG2a for 1h at 4°C. Cells were then washed and incubated with a PE-conjugated goat anti-murine IgG for 1h at 4°C. Cell surface staining was analyzed by FACS.



InvivoGen 社はさらに多くの新型コロナウイルス関連製品を用意しています。全製品ラインアップは同社ウェブサイトをご覧ください！



<https://www.invivogen.com/covid-19>

Neutralization Assays

InvivoGen 社はモノクローナル抗体および / または新型コロナウイルス感染症から回復した患者あるいはスパイク変異株に対するワクチンの接種者からの血清抗体の中和力を研究する製品を幅広く提供しています。

Spike-pseudotyped lentiviral infection

特別なバイオセーフティ研究施設 (BSL-3) 不要で宿主細胞へのウイルスの侵入を研究するために、スパイクシュドタイプのレンチウイルス粒子が新型コロナウイルスの模倣体として広く使用されています。

InvivoGen 社はさまざまなスパイク変異体をコードする **pLV-スパイクプラスミド** のコレクションを提供しています。付属品および GFP レポータープラスミド (別途必要) との組み合わせにより、これらのプラスミドはスパイクシュドタイプのレンチウイルス粒子を作ることができます。新型コロナウイルス宿主受容体を発現する許容状態の細胞株 (例: **A549-hACE2-TMPRSS2** または **HEK-Blue™ hACE2-TMPRSS2** 細胞) のシュドタイプ粒子による感染は、GFP 発現により測定されます。このアッセイはウイルス侵入の研究に理想的であり、低分子阻害剤と同様に抗体の中和能力の試験に使用できます。

B.1.1.7 スパイクシュドタイプのレンチウイルス粒子を使用した場合、全ての試験された臨床由来モノクローナル抗体において、感染の阻害が確認されています (Fig. 3a)。

一方で、B.1.351 シュドタイプ粒子による感染では、イムデビマブ由来モノクローナル抗体によってのみ、阻害効果が確認されています (Fig. 3b)。

Spike-ACE2-dependent cell fusion

InvivoGen 社は新型コロナウイルス重症患者の肺で確認される、新型コロナウイルス誘導性合胞体形成を模倣するアッセイを開発しました。これはスパイク-ACE2 依存性の細胞融合を研究するための、簡単で、定量的な比色アッセイです。

このアッセイの読出は、NF-κB-SEAP 誘導性レポーター遺伝子を発現する受取側の「アクセプター細胞株」への「ドナー細胞株」からのアダプター分子 MyD88 移行を利用しています。

・ドナー細胞: **pUNO1-Spike** プラスミドのトランスフェクションにより、スパイク変異体を共発現する **293-hMyD88** 細胞です。

・アクセプター細胞: **HEK-Blue™ hACE2** または **A549-Dual™ hACE2-TMPRSS2** 細胞です。

「ドナー」細胞と「アクセプター」細胞の共培養により、スパイク-ACE2 依存性の細胞融合が誘導されます。「ドナー」細胞中の過剰発現した MyD88 はシグナル伝達カスケードを活性化し、「アクセプター」細胞による NF-κB 依存性の SEAP 産生をもたらします。SEAP 活性は検出試薬の QUANTI Blue™ 溶液を使用して評価できます。

抗体の中和力は SEAP 産生の減少を測定することで測定されます。Fig.4 でわかるように、**Anti-CoV2RBD-imd-mlgG2a** は野生株および P.1 変異株において細胞融合を阻害します。一方で、**Anti-CoV2RBD-cas-mlgG2a** は同じ P.1 変異株において阻害効果の減少を示しています。

PRODUCTS	QTY	CAT. CODE
pUNO1-SpikeV'X'	20 µg	p1-spike-v'x'
293-hMyD88 Cells	3 - 7 x 10 ⁶ cells	293-hmyd
HEK-Blue™ hACE2 Cells	3 - 7 x 10 ⁶ cells	hkb-hace2
A549-Dual™ hACE2-TMPRSS2 Cells	3 - 7 x 10 ⁶ cells	a549d-cov2r

'x' refers to the in-house number of the Spike variant (see table on the front page).

More info at: www.invivogen.com/293-hmyd88

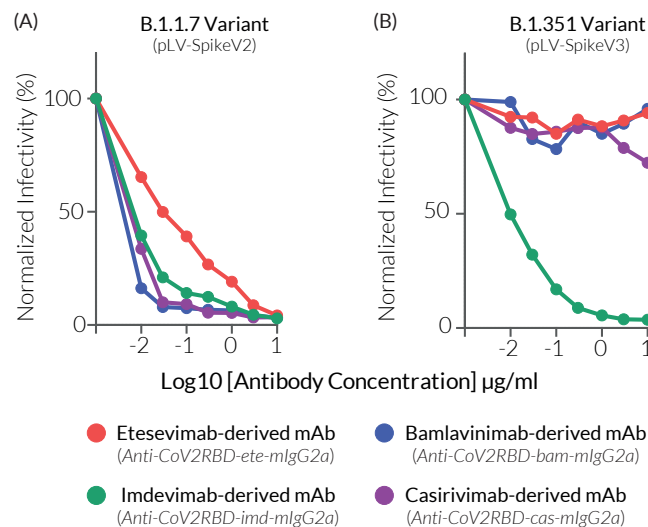


Fig 3: Spike-pseudotyped particle-based inhibition assay. A549-hACE2-TMPRSS2 cells were cultured in the presence of Anti-CoV2RBD-cas-mlgG2a, Anti-CoV2RBD-imd-mlgG2a, Anti-CoV2RBD-bam-mlgG2a or Anti-CoV2RBD-ete-mlgG2a antibodies. Either (A) B.1.1.7 (pLV-SpikeV2) or (B) B.1.351 (pLV-SpikeV3) Spike-pseudotyped GFP lentiviral particles were added to the cells. After 72h, the transduction efficiency (% infectivity) was evaluated by FACS.

PRODUCTS	QTY	CAT. CODE
pLV-SpikeV'X'	20 µg	plv-spike-v'x'
A549-hACE2-TMPRSS2 Cells	3 - 7 x 10 ⁶ cells	a549-hace2tpsa
HEK-Blue™ hACE2-TMPRSS2 Cells	3 - 7 x 10 ⁶ cells	hkb-hace2tpsa

'x' refers to the in-house number of the Spike variant (see table on the front page).

More info at: www.invivogen.com/spike-pseudotyping-vectors

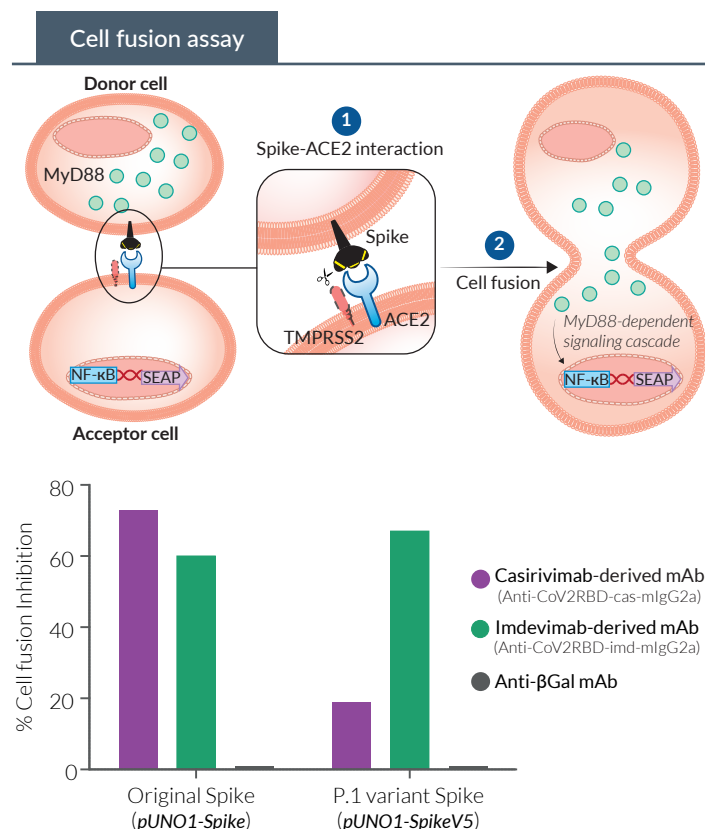


Fig 4: Cell fusion inhibition assay. 293-hMyD88 cells were transfected with either the pUNO1-Spike or pUNO1-SpikeV5 plasmid and then incubated with Anti-CoV2RBD-cas-mlgG2a, Anti-CoV2RBD-imd-mlgG2a, or Anti-βGal antibodies. These cells were then co-cultured with HEK-Blue™ hACE2 cells. After overnight incubation, cell fusion was assessed by measuring the activity of SEAP in the supernatant using QUANTI-Blue™ Solution.

The new way to detect Mycoplasma

科学業界において、マイコプラズマ解決法開発の経験を 40 年以上蓄積する InvivoGen 社は、細胞培養中のマイコプラズマ検出に特別な研究室の設備が不要で、簡単なストリップ型試験法 MycoStrip™ を提供しています。重要な点は、1 時間足らずで結果が得られることです。MycoStrip™ はどのような汚染に対しても迅速に対応します。

● MycoStrip™ NEW

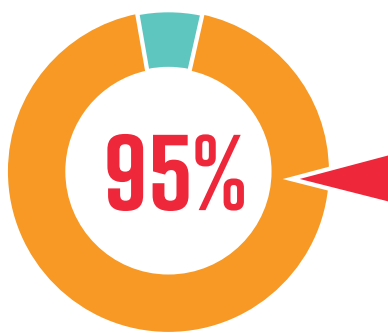
その他の手間のかかる検出方法は忘れてください! MycoStrip™ は細胞培養中のマイコプラズマ汚染を簡単かつ迅速に検出できる高感度な方法です。MycoStrip™ による検出は、等温 PCR に基づいています。サンプルに、InvivoGen 社独自の Reaction Mix を加えるだけで、細胞培養で最もよく見られるマイコプラズマ種の 16S rRNA 遺伝子を標的として増幅することができます。結果は、5 分以内にラテラルフロー検出ストリップ上にバンドとして、はっきりと可視化されます。

Key Features

- ・ **簡便** : 必要なものはヒートブロックのみ
- ・ **迅速** : 2~5 分以内で結果を取得
- ・ **簡単に判定** : ストリップ上にバンドが 1 本または 2 本
- ・ **最低実作業時間** : 15 分未満
- ・ **合計所要時間** : 1 時間以内
- ・ **高感度** : わずか 1×10^2 CFU/ml まで検出可能
- ・ **特異的** : 交差反応なし
- ・ **安定** : キットは -20°C で 1 年間保管可能

Mycoplasma Detection with MycoStrip™

MycoStrip™ は細胞培養で最もよく汚染される、マイコプラズマとアコレプラズマ種を検出するために特別にデザインされました。これらは全ての汚染の 95% を占める 6 種を含んでいます (下記参照)。重要な点は、MycoStrip™ は他の試験されたバクテリア、真菌、または哺乳類の DNA と交差反応を示しません。



MYCOPLASMA:
M. orale
M. hyorhinis
M. arginini
M. fermentans
M. hominis
ACHOLEPLASMA:
A. laidlawii

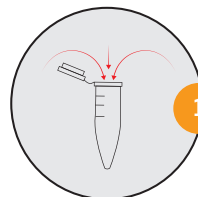
PRODUCT	DESCRIPTION	QTY	CAT. CODE
MycoStrip™	Mycoplasma contamination detection kit (strips)	10 tests	rep-mys-10
		20 tests	rep-mys-20
		50 tests	rep-mys-50



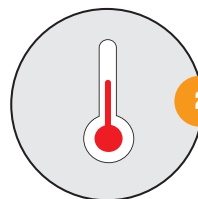
www.invivogen.com/mycostrip

Detection with MycoStrip™

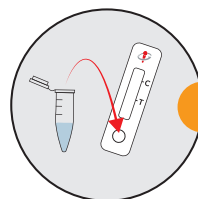
DETECT MYCOPLASMA IN 4 EASY STEPS



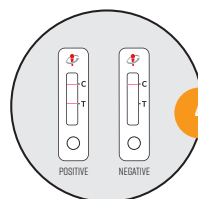
1 PREPARE YOUR SAMPLE (~5 MINS)



2 INCUBATE AT 65°C FOR 40 MINUTES



3 STOP THE REACTION AND LOAD THE CASSETTE



4 READ YOUR RESULTS WITHIN 2-5 MINUTES



WHAT IF MY TEST IS POSITIVE?

ご心配なく! InvivoGen 社の抗バクテリア製品群を使えば、簡単に培養物を救出できます。

大変評判が良く、即効性のある同社のマイコプラズマ除去試薬 Plasmocin™ または Plasmocure™ を使用して、培養物を処理し、汚染を根絶しましょう。処理完了後 (約 2 週間)、MycoStrip™ を使用して再試験し、処理した培養物を処理前のサンプルと比較してください。

For more information visit: www.invivogen.com/mycoplasma-elimination

InvivoGen

Europe Tel: +33 562 71 69 39
USA Tel: +1 888 457 5873
Asia Tel: +852 3622 3480

Fax: +33 562 71 69 30
Fax: +1 858 457 5843
Fax: +852 3622 3483

info.eu@invivogen.com
info@invivogen.com
info.hk@invivogen.com