



この説明書をよく読んでから使用して下さい。
また必要な時に読めるように保管して下さい。

研究用試薬

WAKFlow® HLA タイピング試薬 HLA-DRB1

WAKFlow® HLA タイピング試薬は HLA の遺伝子型を決定するための研究用試薬です。本品は DNA タイピング法の 1 つである PCR-SSOP (Sequence Specific Oligonucleotide Probe) 法に基づき、フローサイトメトリーを応用した Luminex 社の xMAP 測定技術 (http://www.luminexcorp.com/01_xMAPTechnology/index.html) を用いて HLA 遺伝子のタイピングを行うものです。

測定原理

本製品では、5' 末端ビオチン標識プライマーを用いて目的の遺伝子領域を PCR 法で増幅させます。この増幅 DNA を、蛍光で色分けしたビーズ上のプローブとハイブリダイズさせます。ビオチン標識された増幅 DNA に蛍光標識ストレプトアビジン (SAPE) を結合させた後、ビーズ上の蛍光 (SAPE) とビーズの種類とを同時に検出・識別します。増幅 DNA が結合したビーズ(プローブ)の種類を判定することで遺伝子型を決定します。

キットの構成 (96 検体分)

本製品の構成試薬およびその貯蔵方法は、下記のとおりです。

-15 以下に保存

増幅試薬 (DR 専用) 1323 μ L \times 2 本
DNA ポリメラーゼ液 (DR 専用) 54 μ L \times 1 本

2~8 に保存

変性液 1000 μ L \times 1 本
ハイブリダイゼーション溶液 2200 μ L \times 1 本
ビーズミックス (DR 専用) 330 μ L \times 1 本
SAPE (蛍光ストレプトアビジン) 220 μ L \times 1 本
洗浄液 50 mL \times 1 本
プレートシール 2 枚

注 1) 製品到着後、すぐ使用されない場合は、増幅試薬、DNA ポリメラーゼ液は -15 以下に保存して下さい。

注 2) ビーズミックス、SAPE は遮光して 2~8 に保存して下さい。

必要な装置・器具

本製品に必要な装置、器具および機材については、別冊の「WAKFlow® HLA タイピング試薬 操作説明書」を参照して下さい。

使用上又は取扱い上の注意

1. 試薬に関する注意事項

- ・本品は研究用試薬です。疾病の治療・診断・予防を目的として使用しないで下さい。
- ・本品の構成試薬は別ロットの製品、あるいは別製品の構成試薬と組み合わせて使用しないで下さい。
- ・使用期限を過ぎた試薬は使用しないで下さい。

2. 使用者の危険防止に関する注意事項

試薬類を飲んだりなめたりしないで下さい。試薬が皮膚に付着したり、目や口に入ったりしないよう十分注意して下さい。また誤って皮膚に付着したり、目や口に入ったりした場合は、直ちに水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、異常があれば医師に相談して下さい。

3. 汚染の防止

PCR で増幅した遺伝子により、次の検体や試薬が汚染されると誤ったタイピング結果を導く原因となります。そのため、以下のような汚染防止策を施して、PCR 反応前の検体及び試薬の汚染防止に十分ご注意下さい。

< 作業の区分けによる汚染防止 >

- ・物理的に汚染を防止するために、PCR の反応前後でエリアを変えて操作を行います。使用するピペットおよびチップはそれぞれのエリア専用とし、互いに持ち込まないようにして下さい。
- ・PCR 反応後の操作では専用の作業着を着用し、使用したプラスチック手袋は使い捨てにして他の場所に持ち込まないで下さい。
- ・作業終了後は実験台を 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (家庭用の塩素系漂白剤を 10 倍に希釈したもの) で拭いて下さい。

< 汚染の除去 >

増幅した遺伝子による汚染が疑われた場合には、0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で拭いて下さい。

4. 廃棄物に関する注意事項

PCR 反応液を扱ったチップ等は 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液の入った容器に捨て、そのまま密封して廃棄して下さい。PCR 反応液の入ったチューブはそのまま密封して廃棄して下さい。DNA はオートクレーブでは分解されません。エアロゾルを発生して汚染の原因になりますのでオートクレーブは行わないで下さい。

5. その他の注意

本製品は、改良のため予告なく仕様を変更することもありますのでご了承下さい。

貯蔵方法 キットの構成 の項に記載

有効期間 12 ヶ月 (使用期限は外箱に記載)

包装単位 96 検体

問い合わせ先

湧永製薬株式会社 バイオ事業開発部

〒739-1195 広島県安芸高田市甲田町下甲立 1624

TEL (0826) 45-4625

FAX (0826) 45-4624

URL: <http://www.wakunagahla.jp/>

受付時間 9:00 ~ 17:30 (月~金曜日、但し祝祭日を除く)

製造販売元
湧永製薬株式会社
広島県安芸高田市甲田町下甲立 1624
本社: 大阪市淀川区宮原 4 丁目 5-36
<http://www.wakunaga.co.jp/>

操作方法

1. 検体 (DNA) の調製

検体 (DNA) の推奨濃度は 20 µg/mL です。DNA 抽出の際には、増幅 DNA の混入に注意し、増幅 DNA を扱う部屋と隔離された場所で行って下さい。

2. PCR

注) 以下の操作は汚染防止のため手袋を着用して行って下さい。

- 1) 下記の試薬を混合します。操作は氷上で行って下さい。

<PCR ミックス>

1 検体あたりの組成	
増幅試薬 (DR 専用)	24.5 µL
DNA ポリメラーゼ液 (DR 専用)	0.5 µL

- 2) 1) で混合した PCR ミックス: 25 µL を添加した PCR 用チューブに、検体を 2 µL 加えます。

- 3) サーマルサイクラーにセットし、下記の条件で PCR 反応を行います。

PCR 反応条件				
93	93	60	72	4
3 min	30 sec	30 sec	30 sec	Hold
↑ 40 サイクル				

この PCR 反応はおよそ 1.5 時間で終了します。

この条件は Gold-96well GeneAmpR PCR System 9700 を用いる場合の条件です。

他の装置を用いる場合はアニーリング条件、サイクル数などの変更が必要となることがあります。

Gold-96well GeneAmpR PCR System 9700 で行う場合は、「Selection Method Options」

画面で「Reaction Volume」を 27 µL に、「Ramp Speed」を Max に設定して実行して下さい。

3. ハイブリダイゼーションと検出

(1) 準備

・55 hold に設定したサーマルサイクラーを用意します。

・Luminex を起動し、Luminex XYP を 37 に設定しておきます。

Luminex を 4 時間以上放置するとレーザーが消え、ウォームアップに 30 分かかりますのでご注意下さい。

(2) ハイブリダイゼーションと検出の手順

注) 以下の 1)~5) の操作は、汚染防止のため手袋を着用して行って下さい。

変性液はアルカリ性です。変性液の使用時には保護眼鏡を着用し、試薬が皮膚・目・粘膜に触れないように注意して下さい。もしこのようなことが起きた場合は直ちに水で十分に洗い流して下さい。こぼれた場合は水で希釈してから拭き取って下さい。

・以下の操作は、96 ウェル PCR 反応トレイを用いて行います。96 ウェル PCR 反応トレイを用いると検体数が多い場合でも迅速な処理が可能です。

- 1) **変性液: 5 µL** を分注した 96 ウェル PCR 反応トレイのウェルに、PCR 反応終了後の**増幅 DNA: 5 µL** を加え、ボルテックスまたはピペティング (4 回) でよく混合し、室温に 5~10 分間 放置します。
- 2) 下記の試薬を混合します。

<ハイブリミックス>

1 検体あたりの組成	
ハイブリダイゼーション溶液	20 µL
ビーズミックス (DR 専用)	3 µL
SAPE (蛍光ストレプトアビジン)	2 µL

ビーズミックスは使用前にボルテックスなどでしっかりと攪拌して下さい。

- 3) 1) で変性した増幅 DNA に、2) で調製した**ハイブリミックス: 25 µL** を加え、シールをした後、ボルテックスでよく攪拌します。シールに付着した反応液はスナッピングでできるだけ反応容器内に落とします。

- 4) **55** に設定したサーマルサイクラーに **30 分間** 放置し、ハイブリダイゼーションを行います。

- 5) **洗浄液: 75 µL** を各ウェルに加え、**1 分間遠心分離**を行います。遠心分離の後、**上清をスナッピングにより除きます** (溶液がほとんど残らないようにして下さい)。

プレート遠心分離機では 3,000rpm (約 1000×g) で 1 分間の遠心分離を行います。

溶液が多く残った場合は、5) の操作をもう一度繰り返して下さい。

- 6) **洗浄液: 75 µL** を各ウェルに加えます。

- 7) Luminex XYP のブロック温度が 37 であることを確認して、専用 (製品ロットで異なります) のプレートファイルを使用して測定します。

この段階で室温放置すると、非特異反応の原因となりますのでご注意下さい。

- 8) 測定結果の CSV ファイルを「**WAKFlow**® Typing Software」で開き、判定を行います。

測定結果の判定法

各蛍光ビーズの陽性・陰性を判定表に記載しているカットオフ値をもとに自動判定します。各々のビーズの蛍光強度がカットオフ値以上を示す場合を陽性とし、各ビーズの陽性・陰性のパターンから HLA 遺伝子のタイプを決定します。判定は専用の判定ソフト「**WAKFlow**® Typing Software」を無料にて配布しておりますのでご利用下さい。判定に用いる HLA 遺伝子のアليلは Anthony Nolan Research Institute HLA Informatics Group (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>) によって毎年 1 月に報告されているものを使用しております。

性能

1. 正確性

HLA-DRB1 抗原の遺伝子型が既知である標準検体を用いて、操作手順に従い試験を行うとき、その検体の遺伝子型と一致する判定結果が得られます。

2. 感度

遺伝子型が既知である標準検体 (20ng/µL の染色体 DNA 検体および 200fg/µL のプラスミド DNA) を用いて、操作手順に従い試験を行うとき、標準検体がプローブに相補的な配列を持つ場合には設定した値以上のシグナル (陽性値) が得られ、相補的な配列を持たない場合には設定した値以下のシグナル (陰性値) が得られます。

3. 同時再現性

正確性試験を 3 回同時に行うとき同一の判定が得られます。