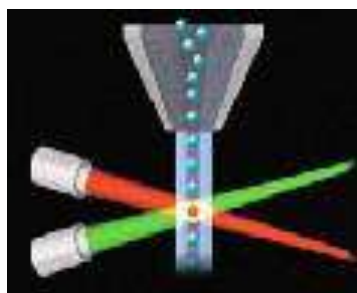


# **WAKFlow**

## HLA タイピング試薬 操作説明書



2022年 6月 改訂

2021年 6月 前回改訂

**湧永製薬株式会社**

# 目次

---

1. 測定原理 .....	1
2. 製品内容(キットの構成).....	2
3. 使用手順 .....	2
3.1 PCR 汚染防止のための注意事項.....	2
3.2 必要な装置・器具 .....	3
3.3 操作手順 .....	4
1. 検体(DNA)の調製	
2. PCR	
3. ハイブリダイゼーションと検出	
3.4 測定結果の判定法.....	7
4. 使用上又は取扱い上の注意 .....	7
《有効期間》 .....	8
《包装単位》 .....	8
《問い合わせ先》 .....	8

## 別紙

フローシート 1. **WAKFlow** HLA タイピング試薬-操作概要と原理-

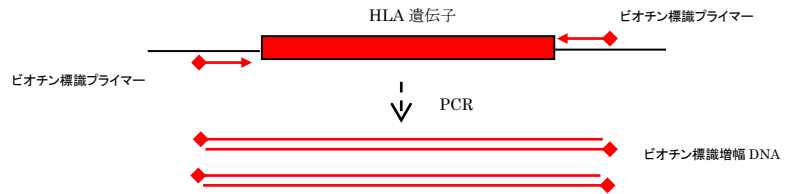
フローシート 2. **WAKFlow** HLA タイピング試薬-アッセイ手順-

## 1. 測定原理

**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、Luminex 社 (<http://www.luminexcorp.com/>) の xMAP® テクノロジーを用いて HLA 遺伝子のタイピングを行うものです。操作は以下の 3 つのステップから成ります。

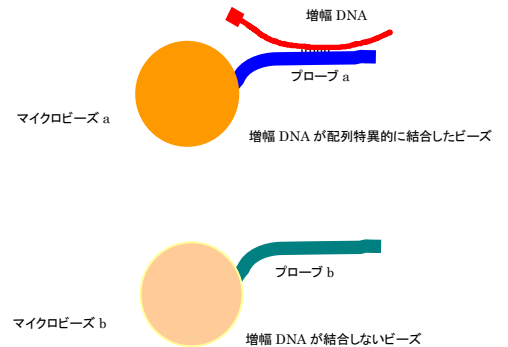
### I) PCR

本品では 5'末端をビオチンで標識したプライマーを用いて検体の HLA 遺伝子のエクソン領域をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅します。この反応により、ビオチンで標識された増幅 DNA が得られます。



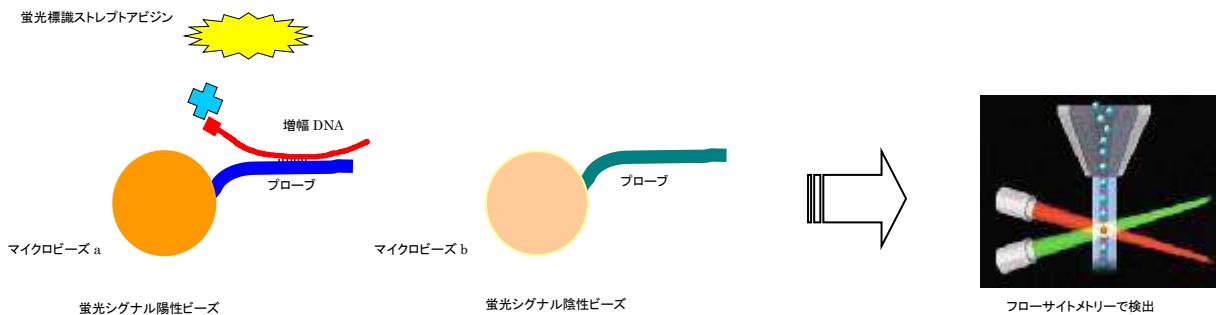
### II) ハイブリダイゼーション

増幅 DNA をアルカリ変性処理により 1 本鎖 DNA とし、あらかじめプローブが固定されたマイクロビーズと混合します。各マイクロビーズに固定されたプローブは、各 HLA タイプに特異的な配列となっており、増幅 DNA はその HLA タイプに対応したプローブと特異的に結合します。



### III) 蛍光ストレプトアビジン標識および検出

各マイクロビーズは蛍光色素で色分けされています。また、増幅 DNA が結合したマイクロビーズからはビオチンを介した蛍光 (フィコエリスリン) 標識ストレプトアビジンの結合による蛍光シグナルが得られます。フローサイトメトリーを応用した Luminex 社の xMAP® テクノロジーを用いる事で、蛍光ビーズの種類 (色分け) と増幅 DNA の結合による蛍光を識別して同時に検出します。増幅 DNA が結合したビーズの種類から、遺伝子タイプを決定します。



## 2. 製品内容(キットの構成)

本製品は、以下の試薬から構成されています。

これらの構成試薬は、異なる製造番号の製品、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ください。

	96テスト	48テスト
<b>-15℃以下に保存</b>	<b>96テスト</b> ・ HLA-A ・ HLA-B ・ HLA-C ・ HLA-DRB1	<b>48テスト</b> ・ HLA-DQB1 ・ HLA-DQA1 ・ HLA-DPB1
①増幅試薬	1,323 μL×2本、	1,323 μL×1本
②DNA ポリメラーゼ液	54 μL×1本、	27 μL×1本
<b>2～8℃に保存</b>		
③変性液	1,000 μL×1本、	1,000 μL×1本
④ハイブリダイゼーション溶液	2,200 μL×1本、	1,100 μL×1本
⑤ビーズミックス	330 μL×1本、	165 μL×1本
⑥SAPE(蛍光streptavidin)	220 μL×1本、	110 μL×1本
⑦洗浄液	50 mL×1本、	50 mL×1本
・プレートシール	2枚、	2枚

注1) 製品到着後、すぐ使用されない場合は、①増幅試薬、②DNAポリメラーゼ液は-15℃以下に保存してください。

注2) ⑤ビーズミックス、⑥SAPEは遮光して2～8℃に保存してください。

## 3. 使用手順

### 3.1 PCR汚染防止のための注意事項

PCR前の検体および試薬の汚染防止に注意を払ってください。特に増幅する前の反応溶液に増幅DNAが少量でも混入(キャリーオーバー)して汚染されると、誤ったタイピング結果を導く原因となります。汚染防止のため、操作の際は以下の点にご留意ください。

1. PCR反応液を調製する部屋と、増幅DNAを扱う部屋(タイピングを実施する部屋)は分けてください。
2. 増幅DNAを扱う機器、機材(サーマルサイクラー、アスピレーター)を、PCR反応液を調製する部屋に持ち込まないでください。
3. 増幅DNAを扱う時は専用の作業着を着用し、またプラスチック手袋はディスポーザブルのものを使用し、他の部屋には持ち込まないでください。
4. サーマルサイクラーは、DNA抽出やPCR反応液を調製するエリアには設置しないで下さい。
5. 作業終了後は実験台を0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液又は家庭用の塩素系漂白剤を水道水で10倍に希釈したもので拭き、除染を徹底してください。

## 3.2 必要な装置・器具

### (1) PCR

- ・サーマルサイクラー

■以下の機器を推奨いたします。

- ・VeritiPro™ 96-Well サーマルサイクラー® 0.2 mL、Veriti™ 96-Well サーマルサイクラー® 0.2 mL、および Gold-96well GeneAmp® PCR System 9700
- ・マイクロピペット(可変式:2~20 µL, 20~200 µL, 200~1000 µL)
- ・滅菌済みチップ
- ・滅菌済み 0.2 mL PCR 用チューブ(または 96 ウエルトレイ)



Gold-96well GeneAmp® PCR System 9700



マイクロピペット

### (2) ハイブリダイゼーション

- ・96 ウェル PCR 反応トレイ

■以下のトレイを推奨いたします。

- ・AB-0700 : Thermo-Fast® 96 Non-Skirted, Low Profile (サーモフィッシャーサイエンティフィック)
- ・マルチチャンネルピペット
- ・マイクロピペット(可変式:可変式:2~20 µL, 20~200 µL, 200~1000 µL )
- ・連続分注器
- ・ボルテックスミキサー
- ・マイクロプレート遠心分離装置



マルチチャンネルピペット



連続分注器



ボルテックスミキサー



マイクロプレート遠心分離装置

### (3) 検出と解析

- ・Luminex システム
- ・パーソナルコンピュータ



Luminex システム

### 3.3 操作手順

#### 1. 検体 (DNA) の調製

DNA 抽出は、汚染防止のため増幅 DNA を扱うエリアとは別のエリアで行ってください。  
検体 (DNA) は DNA 濃度が 5~40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を推奨) となるように調製します。

#### 2. PCR

##### (1) PCR 反応溶液の調製

以下の操作は汚染防止のため手袋を着用して行ってください。

1) 下記の試薬を混合します。

<PCR ミックス>

1 検体あたりの組成	
① 増幅試薬 (各 Locus 専用)	24.5 $\mu\text{L}$
② DNA ポリメラーゼ	0.5 $\mu\text{L}$



- 複数の検体数をタイピングする場合は、各試薬をあらかじめ調製 (検体数より 1 割程度多めに調製) し、25  $\mu\text{L}$  ずつ分注してください。
- 分注前には増幅試薬をよく混和してください。
- 非特異的な遺伝子増幅を防ぐため PCR 反応溶液の調製は氷冷して行ってください。

2) 1) で混合した PCR ミックス: 25  $\mu\text{L}$  を添加した PCR 用チューブに、検体 (DNA) を 2  $\mu\text{L}$  加えます。

- 1 検体毎にピペットのチップを交換してください。

3) サーマルサイクラーにセットし、下記の条件で PCR を行います。

PCR の反応条件

93°C	→	93°C	→	60°C	→	72°C	→	4°C
3 min		30 sec		30 sec		30 sec		Hold
		↑			↓			
		40 サイクル						

- この条件は、「VeritiPro™ 96-Well サーマルサイクラー® 0.2 mL」、「Veriti™ 96-Well サーマルサイクラー® 0.2 mL」および「Gold-96well GeneAmp® PCR System 9700」を用いる場合の条件で、PCR はおよそ 1.5 時間で終了します。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。
- Veriti™ 96-Well サーマルサイクラー® 0.2 mL で行う場合は、初期画面より「Tools Menu」で「Convert a Method」を選択し、「9700 Mode」または「9700 Max Mode」から、PCR の反応条件の設定を行ってください。「Reaction Volume」は 27  $\mu\text{L}$  に設定してください。
- VeritiPro™ 96-Well サーマルサイクラー® 0.2 mL で行う場合は、プログラム選択後、「Actions」内の「Simulation Mode」から「GeneAmp® PCR System 9700」を選択してください。
- PCR 終了後、すぐにハイブリダイゼーション以降の操作を行わない場合は、反応液を 4°C に保管して下さい。室温に放置されますと、蛍光シグナルが低くなる場合があります。

### 3. ハイブリダイゼーションと検出

<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、LuminexXYP 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ください。
- ・③変性液、④ハイブリダイゼーション溶液、⑦洗浄液を取り出し室温にします。

※ 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ください。  
※ 以下の操作は、96 ウェル PCR プレートを用いて行います。

- 1) ③変性液:5  $\mu$ L をウェル(96 ウェル PCR プレート)に分注します。



注意) ③変性液はアルカリ性です。使用時には保護眼鏡を着用し、試薬が皮膚・粘膜に触れないように注意してください。(詳しくは、巻末を参照してください。)

- 2) PCR 終了後のじゅうぶんに室温に戻した増幅 DNA :5  $\mu$ L を加え、ピペッティング(4 回)またはボルテックスでよく混合し、室温に 5~10 分間放置します。



- 3) 1)、2)の反応中に下記の試薬を混合します。

<ハイブリミックス>

1 テストあたりの組成	
④ ハイブリダイゼーション溶液	20 $\mu$ L
⑤ ビーズミックス(各 Locus 専用)	3 $\mu$ L
⑥ SAPE(蛍光ストレプトアビジン)	2 $\mu$ L



- 必要量の 1 割増の量を調製します。
- ⑤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ください。

- 4) 2)で変性した増幅 DNA に、3)で調製したハイブリミックス:25  $\mu$ L を手早く加え、しっかりとシールをした後、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によりできるだけ反応容器内に落とします。



- 5) 55°Cに設定したサーマルサイクラーに直ちに4)のプレートをセットし、30分間のハイブリダイゼーションを行います。

■ ハイブリダイゼーションを行っている間に、Luminex の測定準備 (Prime、Alcohol Flash、Wash、必要に応じて Calibration、Verification) をしておきます。

- 6) ⑦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。

■ プレート遠心分離機で 3000rpm (約 1000×g) で 1 分間の遠心分離を行います。



- 7) 上清をスナッピングまたはアスピレーションで除きます (溶液がほとんど残らないようにしてください。溶液が多く残った場合は、バックグラウンド上昇の原因となる場合がありますので、6)の操作をもう一度繰り返してください。)



- 8) ⑦洗浄液:75 μLをウェルに加えます。



- 9) Luminex XYP のブロック温度が 37°Cであることを確認して、各抗原ビーズミックスの Lot 番号に対応したプロトコルファイルに検体数を入力し、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、速やかに測定を開始してください。検体をすぐに測定しない場合は、37°C、暗所に保管してください。



### 3.4. 測定結果の判定法

測定結果の CSV ファイルを「**WAKFlow Typing Software**」で開き、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。自動判定では、蛍光強度がカットオフ値以上を示す場合を陽性、カットオフ値以下を示すビーズを陰性とし、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。



- ビーズミックスの Lot 番号に対応していないパターンファイルでは判定できませんので注意してください。
- 専用の判定ソフトウェア(「**WAKFlow Typing Software**」)は、試薬ご購入の際、無償にて提供いたします。

なお、判定に用いる HLA 遺伝子のアレルは Anthony Nolan Research Institute HLA Informatics Group 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。

## 4. 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ください。  
使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。

### 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ください。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ください。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ください。

### 3. 汚染の防止

PCR で増幅した DNA 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 PCR 前の検体および試薬の汚染防止に十分ご注意ください。

#### <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ください。
- ・PCR 後の操作はエリア専用の作業着を着用して行ってください。使用した手袋は使い捨てとし、他の場所に持ち込まないでください。
- ・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)で拭いてください。

#### <汚染の除去>

PCR で増幅した DNA 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ください。

#### 4. 廃棄物に関する注意事項

PCR で増幅した DNA を扱ったチップなどは 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ください。検査終了後、使用した PCR 用チューブや 96 ウェル PCR プレートは、オートクレーブしないでそのまま密封して廃棄してください。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ください。

#### 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ください。

#### 《有効期間》

18 ヶ月

#### 《包装単位》

96 テストまたは 48 テスト

#### 《問い合わせ先》

##### 湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部

〒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 時～12 時、13 時～17 時 30 分（月～金曜日、但し祝日を除く）

製造販売元

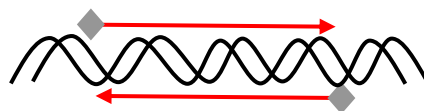
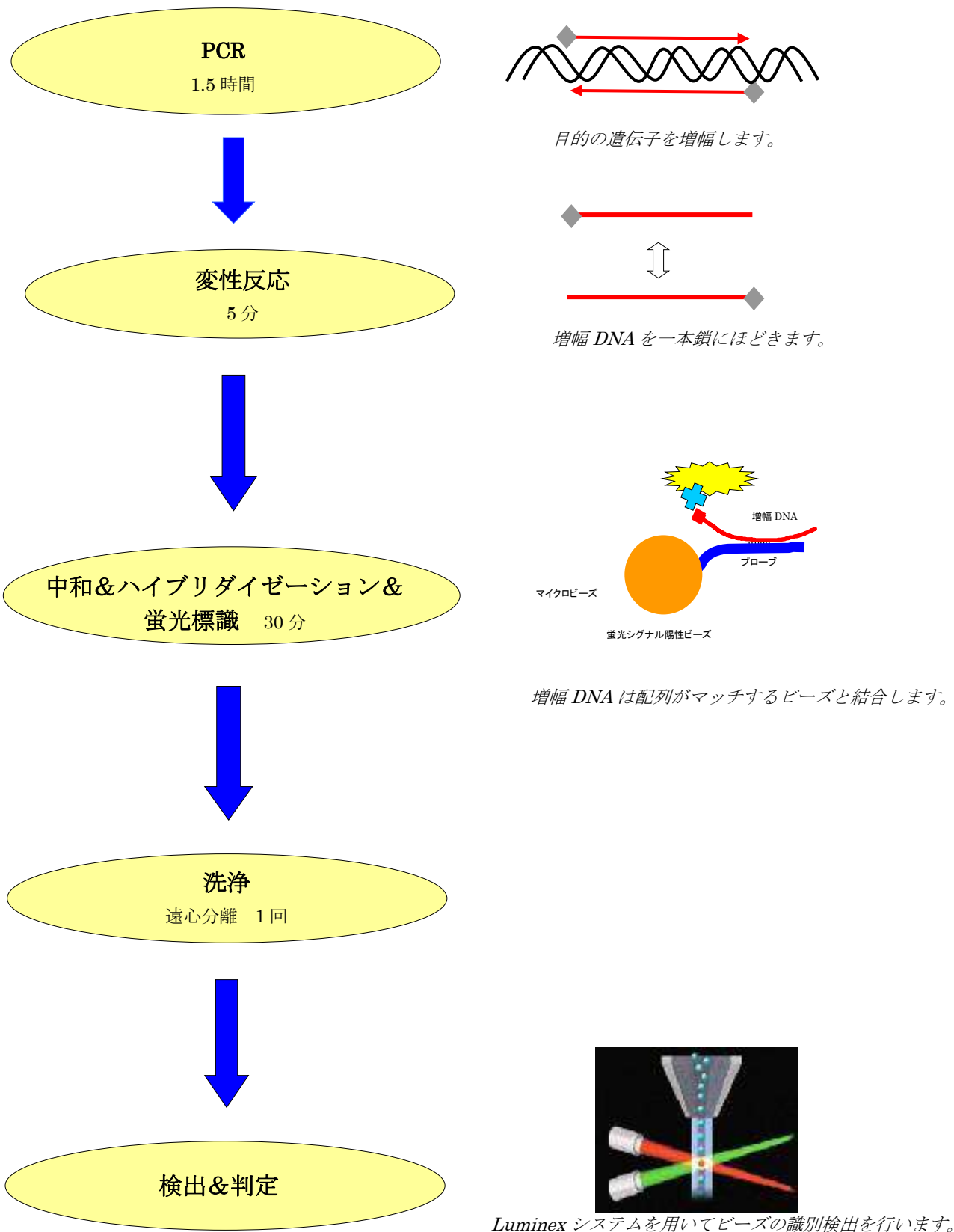
## 湧永製薬株式会社

広島県安芸高田市甲田町下甲立 1624

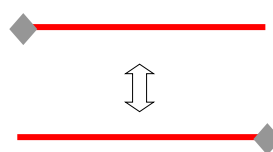
<http://www.wakunaga.co.jp/>

別紙

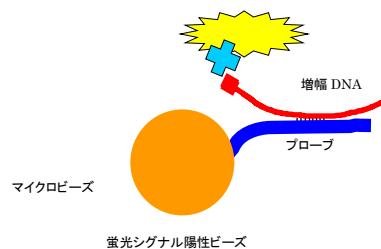
フローシート1. **WAKFlow**HLA タイピング試薬 —操作の流れ—



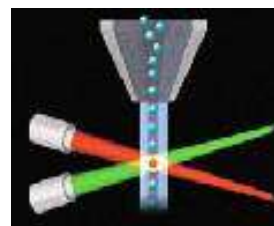
目的の遺伝子を増幅します。



増幅 DNA を一本鎖にほどきます。



増幅 DNA は配列がマッチするビーズと結合します。



Luminex システムを用いてビーズの識別検出を行います。

フローシート 2. **WAKFlow HLA タイピング試薬** —アッセイ手順—

