

《使用上又は取扱い上の注意》

1. 一般的注意

- ・ 本製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。
- ・ 試薬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、目や口に入らないよう、十分に注意してください。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、異常があれば医師の診療を受けてください。

2. 使用者の危険防止に関する事項

(1) ウイルス、細菌

- ・ 検体血清は、感染性があるものとして取り扱い、専用エリアで操作してください。
- ・ 使用するピペットおよびチップは、各エリア専用としてください。
- ・ エリア専用の作業着を着用し、使い捨てのプラスチック手袋を使用してください。
- ・ 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。
- ・ 実験台等に血清が付着した場合は、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で拭いてください。

(2) 廃棄物

血清を扱ったものは、オートクレーブ後、廃棄してください。あるいは医療用廃棄物として廃棄してください。医療用廃棄物としての廃棄方法は、各実験施設の廃棄方法に従ってください。

3. 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がありますのでご了承ください。

《貯蔵方法》 《キットの構成》の項に記載  
 《有効期間》 12ヵ月(使用期限は外箱に記載)  
 《包装単位》 10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  
 受付時間 9時～12時、13時～17時(土、日、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/>

CCF3D01

この説明文書をよく読んでから使用してください。  
また、必要時に読めるように保管してください。

研究用試薬

## WAKFlow HLA 抗体 C3d 検出試薬

**WAKFlow** HLA 抗体 C3d 検出試薬は、血清中の抗 HLA 抗体を介して産生された補体(C3d)を検出するための研究用試薬です。本製品は、Luminex テクノロジー(xMAP®)を用いて検出を行うものです。

《測定原理》

検体血清と精製 HLA 抗原が固定されたビーズミックスを混合し、ビーズ上の HLA 抗原に検体血清中の抗 HLA 抗体を結合させます。次に、補体成分を十分に含むヒト血清を添加します。補体経路の活性化によって産生された C3d に対し Phycoerythrin (PE) 標識抗 C3d 抗体を反応させます。Luminex 装置にて各ビーズ上の PE 蛍光値を検出し、解析ソフトウェアを用いて抗 HLA 抗体の C3d 結合性を算出します。

《キットの構成》

本製品の構成試薬および貯蔵方法は、以下のとおりです。

2～8℃保存

- ① ポジティブコントロールビーズ(ポジコンビーズ)・C3d ..... 20 µL × 1本
- ③ PE 標識抗 C3d 抗体 ..... 50 µL × 1本

−80℃保存

- ② ヒト補体血清 ..... 500 µL × 2本

注1) ①および③の試薬は遮光し、凍結を避け 2～8℃で保存してください。  
 注2) ②の試薬は到着後速やかに−80℃に保存してください。凍結融解は 3 回までとし、使用後は速やかに−80℃に戻してください。

《必要な装置・器具》

**本製品は、必ず対応した Lot 番号の「WAKFlow HLA 抗体 クラス I 抗体/クラス II 抗体 特異性同定試薬 (以下、特異性同定試薬)」と組み合わせて使用してください。**

その他に必要な装置、器具および機材については、別冊の「**WAKFlow** HLA 抗体 C3d 検出試薬 操作説明書」をご覧ください。

\*《操作上の注意》

すべての操作は、できるだけ光が当たらないように注意して行ってください。また、EDTA は補体経路を阻害するため、使用しないでください。検体血清については、特異性同定試薬の検体処理液を用いた処理を行わないでください。

## 《操作方法》

### 1. 準備

#### (1) 検体血清の処理

検体血清を 10,000×g で 2 分間遠心分離を行い、不溶物を沈降させます。

#### (2) ビーズの調製

1) ①**ポジコンビーズ・C3d** を 5 秒以上ボルテックスして攪拌します。

2) 1 検体あたり**特異性同定試薬のビーズミックス: 25 μL** に①**ポジコンビーズ・C3d: 2 μL** を添加し、5 秒以上ボルテックスにより攪拌します。

#### (3) ヒト補体血清融解の準備

ヒト補体血清を融解するためにウォーターバスを 37℃ に設定し、温めておきます。

### 2. 操作手順

#### (1) ビーズと検体血清の反応

1) 96 穴 V 底プレートのサンプル数に応じた各ウエルに 1. 準備-(2)で調製した**ビーズミックス: 25 μL** を分注します。

2) 各ウエルに**検体血清: 25 μL** を添加します。

注3) 検体血清採取時は、チューブの壁や底に固着した沈殿物を取り込まないように注意して上清を取り、ウエルに入れてください。

注4) 検体ごとにチップを交換してください。

注5) 必ず血清を使用してください。

3) 反応ウエルに隣のウエルの検体が混入しないように隙間なくシールをした後、遮光して 25℃、30 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。反応中に 37℃ のウォーターバスで②**ヒト補体血清** を融解し、その後速やかに使用してください。

4) 反応後、反応液が隣のウエルに混入しないように注意しながら、慎重にシールをはがします。

注 6) 洗浄は行わず、次のステップに移ってください。

5) 各ウエルに②**ヒト補体血清: 100 μL** を添加し、隙間なくシールをした後、遮光(遮光できるインキュベータ内、あるいはアルミホイル等で覆う)して 25℃、30 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。

6) 反応後、反応液が隣のウエルに混入しないように注意しながら、慎重にシールをはがします。

7) 各ウエルに**特異性同定試薬の洗浄液: 150 μL** を添加し、1,300×g で 2 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またはアスピレーションにより除きます。

8) 各ウエルに**特異性同定試薬の洗浄液: 150 μL** を添加後、隙間なくシールをし、5 秒以上ボルテックスにより攪拌した後、1,300×g で 2 分間遠心分離を行います。遠心分離の後、慎重にシールをはがし、上清をスナッピングまたはアスピレーションにより除きます。

9) 8) の操作を 2 度繰り返します。この遠心分離の間に③**PE 標識抗 C3d 抗体を特異性同定試薬の洗浄液で 10 倍に希釈**しておきます。

10) 各ウエルに**希釈した PE 標識抗 C3d 抗体: 50 μL** を添加します。

11) 隙間なくシールをした後、遮光して 25℃、30 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。

12) 反応後、慎重にシールをはがし、各反応ウエルに**特異性同定試薬の洗浄液: 150 μL** を添加後、1,300×g で 2 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またはアスピレーションにより除きます。

13) 各ウエルに**特異性同定試薬の洗浄液: 75 μL** を添加します。ビーズの塊が見える場合は、隙間なくシールをしてボルテックスにより分散させてください。

#### (2) 測定

Luminex システムを用いて、ビーズミックスの Lot 番号に対応したプロトコールファイルあるいはテンプレートファイルを使用して測定を行います。

< 非特異反応を示す検体血清の場合 >

検体血清によっては、検体中に含まれる IgM が原因で偽陽性を示す場合があります。偽陽性が疑われる場合は、5 mM DTT 等で検体血清を処理し、IgM の影響を除いた後、検査を行ってください。

#### 《測定結果の解析法》

測定結果を「**WAKFlow HLA 抗体解析ソフトウェア**」で解析します。検体血清の反応性は各 HLA 結合ビーズの蛍光値をブランクビーズ (BB) および標準陰性血清の測定値で補正した Calmed 値を用いて解析します。なお、ビーズミックスの Lot 番号に対応していないロットファイルでは正しく解析できませんのでご注意ください。

$$\text{Calmed} = (\text{Xpc} - \text{Xbb}) - (\text{Npc} - \text{Nbb}) * \frac{\text{Xbb}}{\text{Nbb}}$$

「Xpc」; 検体「X」の「ビーズ蛍光値」

「Xbb」; 検体「X」の「ブランクビーズ (BB) 蛍光値」

「Npc」; 「陰性コントロール血清」の「ビーズ蛍光値」

「Nbb」; 「陰性コントロール血清」の「BB 蛍光値」

#### 《性能》

感度、正確性および同時再現性

特定の HLA 分子に反応性を持つ抗体を含んでいることが既知であるアロ血清と陰性標準血清を用いて操作手順にしたがい試験を行うとき、各ビーズは規格内の蛍光値 (Median) が得られます。この試験を 3 回同時に行うとき、同一の結果が得られます。