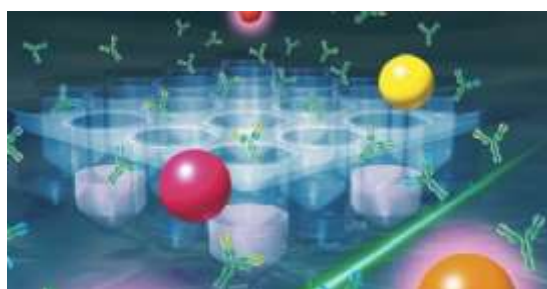


WAKFlow HLA 抗体

C3d 検出試薬

操作説明書

—第2版—



2021年3月改訂

2019年11月作成

湧永製薬株式会社

目次

1. 測定原理	2
2. 製品内容(キットの構成)	3
3. 使用手順	4
3.1 操作上の注意事項	4
3.2 必要な装置・器具	4
3.3 操作方法	5
3.4 測定結果の解析法	7
4. 使用上又は取扱い上の注意	8
《貯蔵方法》	8
《有効期間》	8
《包装単位》	8
《お問い合わせ先》	8

別紙

フローシート: **WAKFlow** HLA 抗体 C3d 検出試薬-原理と操作概要-

1. 測定原理

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 (<http://www.luminexcorp.com>) の xMAP[®]テクノロジーを用いて検出を行うものです。

本製品は必ず対応したロットの「**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。

操作は以下の 3 つのステップから成ります。

I) ビーズと検体血清との反応

検体血清を、あらかじめ特異性同定試薬の HLA 抗原が固定された蛍光ビーズと反応させます。1つの蛍光ビーズに1種類の HLA 抗原が固定されており、検体血清に抗 HLA 抗体が存在する場合は、その抗体が反応性を持つ(CREG (Cross REactivity Group)を含む) HLA 抗原が固定された蛍光ビーズに結合します。



II) ヒト補体血清による補体経路の活性化

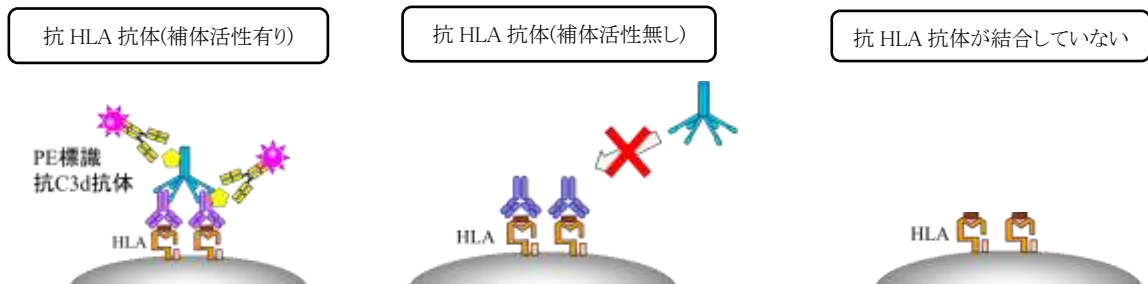
検体血清中の抗 HLA 抗体が補体結合性を持ち、なおかつ補体因子が結合できる程度にビーズに結合した抗体の密度が高い場合、補体経路の活性化が生じ、C3d が産生されます。



Ⅲ) 標識抗体による C3d の検出

ヒト補体血清との反応が終了した蛍光ビーズと PE 標識抗 C3d 抗体を反応させると、補体活性化能のある抗 HLA 抗体が結合した蛍光ビーズには標識抗体が結合します。

各蛍光ビーズは異なった蛍光色素で色分けされていますので、補体活性化能のある抗 HLA 抗体が結合した蛍光ビーズからはビーズ由来の蛍光シグナル以外に標識抗体による蛍光シグナルが得られます。すなわち、蛍光ビーズの種類(色分け)と標識抗体からの蛍光シグナルを識別して同時に検出し、さらに、蛍光シグナルのパターンから、抗 HLA 抗体の C3d 結合性を算出します。



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。

10 テスト/キット

- | | |
|-------------------------------------|-------------------|
| ①. ポジティブコントロールビーズ(ポジコンビーズ)・C3d..... | 20 μ L × 1 本 |
| ②. ヒト補体血清..... | 500 μ L × 2 本 |
| ③. PE 標識抗 C3d 抗体..... | 50 μ L × 1 本 |

注1) ①ポジコンビーズ・C3d、③PE 標識抗 C3d 抗体は、遮光して 2~8°C で保存してください。

注2) ②ヒト補体血清は-80°C で保存してください。

3. 使用手順

3.1 操作上の注意事項

1. 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下さい。
2. 検体血清中にはウイルス、細菌等の感染性のものが含まれている恐れがありますので、感染防止のため、操作の際はご留意下さい。(後述)
3. 検体ごとにチップを交換して下さい。

3.2 必要な装置・器具

(1) ビーズミックスと検体血清反応及び標識抗体による標識反応

・96 穴V底プレート

■以下のプレートを推奨いたします。

96 穴V底マイクロエルプレート(Thermo Fischer Scientific、商品番号#249944)

- ・マイクロピペット(可変式:1~20 μ L, 10~200 μ L, 100~1000 μ L)
- ・マルチチャンネルピペット(あると便利)
- ・連続分注器(あると便利)
- ・ボルテックスミキサー
- ・プレートミキサー
- ・マイクロプレート遠心分離機 (1,300 \times gで使用可能なもの)
- ・マイクロ冷却遠心機 (10,000 \times gで使用可能なもの)



マイクロピペット



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



プレートミキサー



マイクロプレート遠心分離機



マイクロ冷却遠心機

(2) 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 操作方法

3.3.1 準備

(1) 検体血清の調製

検体血清は、アッセイの前に必ず 10,000×g で 2 分間遠心分離し、不溶物を沈降させます。

注3) アッセイの際に不溶物の混入があると、抗原抗体反応を阻害して正しい結果が得られなくなる恐れがあります。

注4) EDTA 処理血清は使用しないで下さい。EDTA によって補体経路が阻害され、正しい結果が得られなくなる恐れがあります。

注5) 正しい結果が得られなくなる恐れがあるため、特異性同定試薬の検体処理液を用いた検体処理は行わないでください。

(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°C に設定し、温めておきます。

注6) ヒト補体血清の凍結融解は 3 回までとし、使用後は速やかに -80°C に戻してください。

注7) 4°C あるいは室温で融解すると補体経路の活性化が生じ、正しい結果が得られなくなる恐れがあります。

注7) 融解後のヒト補体血清はすぐに使用し、ウォーターバスに放置しないでください。

(4) Luminex 装置

ウォームアップを行います。さらに、Luminex XYP の温度設定が OFF になっていることも確認してください。

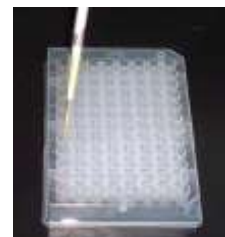
■ Luminex を 4 時間以上放置すると、レーザーが消え、ウォームアップに 30 分かかりますのでご注意ください。

3.3.2 操作手順

(1) ビーズと検体血清の反応

※ 以下の 1)~13) の操作は、感染防止のため手袋を着用して行って下さい。
※ 操作は、96 穴 V 底プレートを用いて行います。

1) 3.3.1 準備-(2)で調製した**ビーズミックス:25 μL** を 96 穴 V 底プレートの各ウェルに分注します。



2) これに**検体血清:25 μ L**を添加します。

■ 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持ち込まないように注意して上清を取り、ウエルに入れて下さい。

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しっかりシールをした後、遮光して 25°C、30 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。

■ 反応を行っている間に、**②ヒト補体血清**の融解、Luminex システムの測定準備をしておきます。



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

注 8) 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 μ L**を添加し、隙間なくしっかりシールをした後、遮光して 25°C、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注意しながら、慎重にシールをはがします。

7) **特異性同定試薬の洗浄液:150 μ L**を各ウエルに加え、プレート遠心分離機で 1,300×g、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で除きます。



8) 各ウエルに**特異性同定試薬の洗浄液:150 μ L**を添加し、しっかりとシールをし、ボルテックスによりよく攪拌した後、1,300×g、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又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、**③PE 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) **希釈した PE 標識抗 C3d 抗体:50 μ L**を各ウエルに添加します。

- 11) しっかりシールした後、遮光(遮光可能なインキュベーター内、あるいはアルミホイル等で覆う)して25°C、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、各ウェルに**特異性同定試薬の洗浄液:150 μL**を加え、1,300×g、2分間遠心分離を行います。その後、上清をスナッピング又はアスピレーションにより除きます。
- 13) 各ウェルに**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ようならシールしてボルテックスにより分散させて下さい。

(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。

■ 検体をすぐに測定しない場合は、暗所に保管して下さい。

<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。

3.4 測定結果の解析法

測定結果のCSVファイルを「**WAKFlow HLA抗体解析ソフトウェア**」で解析します。

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。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テンプレートファイルで測定した場合は正しく解析できませんのでご注意ください。

専用の「**WAKFlow HLA抗体解析ソフトウェア**」は試薬ご購入の際、無償にてご提供いたします。

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

「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」

4. 使用上又は取扱い上の注意

1. 一般的注意事項

- ・本品は研究用試薬です。疾病の治療や診断を目的とし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。
- ・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に注意して下さい。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。

2. 使用者の危険防止に関する注意事項

(1) ウイルス、細菌

- ・検体血清中にはウイルス、細菌等の感染性のものが含まれている恐れがあるものとして取り扱い、専用エリアで操作して下さい。
- ・使用するピペットおよびチップはエリア専用として下さい。
- ・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ご使用下さい。
- ・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。
- ・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下さい。

(2) 廃棄物に関する注意事項

血清を使用したものは、オートクレーブ後廃棄して下さい。あるいは医療用廃棄物として廃棄して下さい。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下さい。

3. その他の注意事項

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》 ①ポジコンビーズ・C3d、③PE 標識抗 C3d 抗体 : 2~8℃保存
②ヒト血清 : -80℃保存

《有効期間》 12 ヶ月(使用期限は外箱に記載)

《包装単位》 10 テスト

《お問い合わせ先》 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

e-mail: wakunaga-hla@wakunaga.co.jp

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

受付時間 9時~12時、13時~17時(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/>