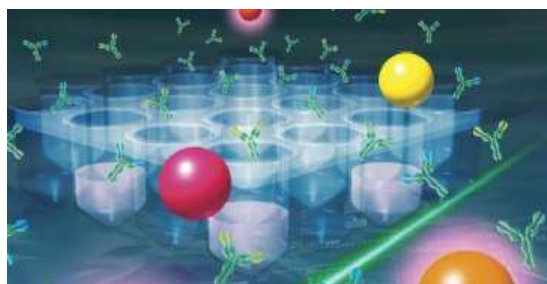


# **WAKFlow HLA 抗体**

## **クラス I & II (ICFA)**

### **操作説明書**

**—第5版—**



2021年3月今回改訂

2018年6月前回改訂

**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 .....	3
3.1 操作上の注意事項.....	3
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.....	8
4. 使用上又は取扱い上の注意 .....	9
《貯蔵方法》 .....	10
《有効期間》 .....	10
《包装単位》 .....	10
《お問い合わせ先》 .....	10

## 別紙

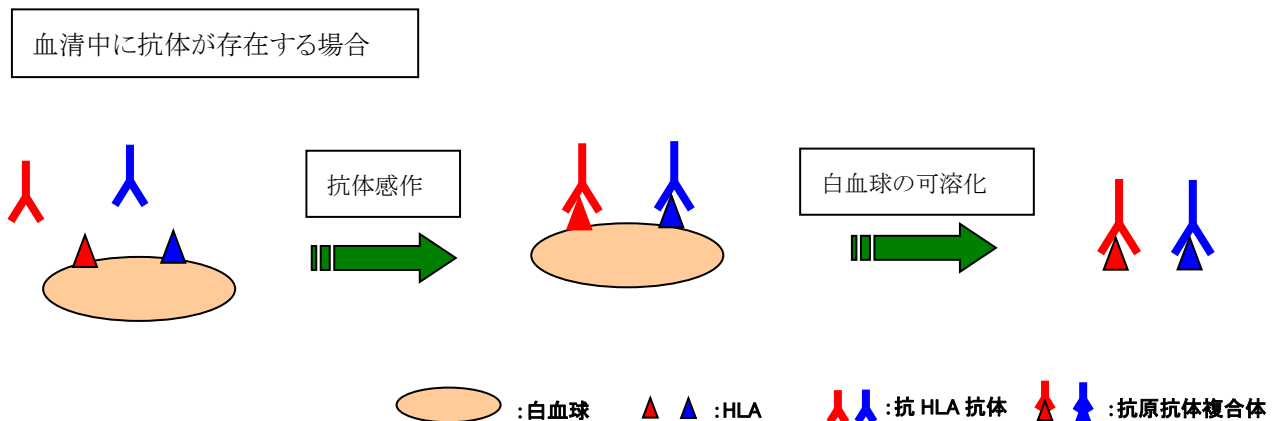
フローシート「**WAKFlow** HLA 抗体クラス I & II (ICFA)」-原理と操作概要

## 1. 測定原理

**WAKFlow HLA 抗体クラス I & II (ICFA)** は、Luminex 社 (<http://www.luminexcorp.com>) の xMAP® Technology (蛍光ビーズ法) を用いて、血液細胞上の HLA クラス I 及び II 抗原に反応した抗体を高感度に検出する研究用試薬で、交差試験に応用できます。操作は以下の2つのステップから成ります。

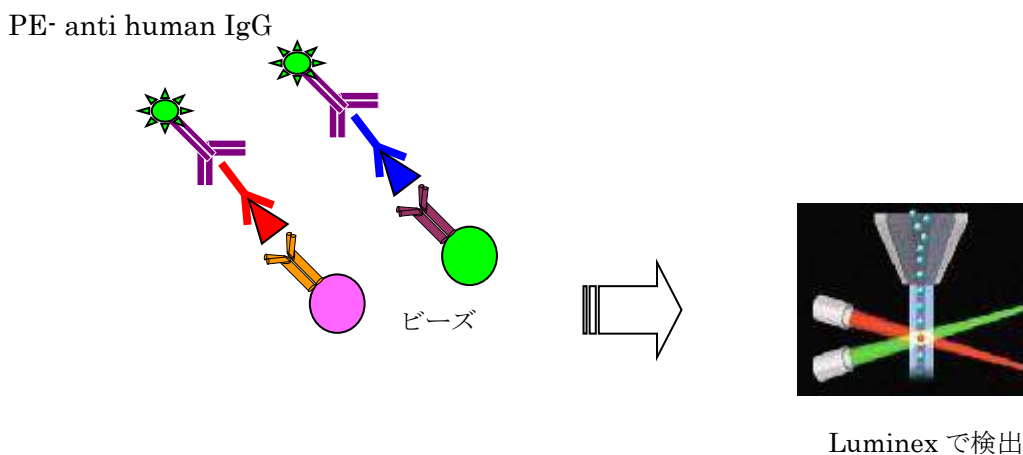
### I) 白血球の抗体感作及び可溶化

HLA クラス I または II 抗原を発現している血液細胞と検体血清とを反応させます。検体血清中に血液細胞上の HLA に対する抗体が存在する場合には、HLA とその抗体との複合体が形成されます。細胞を可溶化すると、形成された抗原抗体複合体が遊離します。



### II) 複合体の捕捉及び標識抗体の反応・検出

遊離した抗原抗体複合体を、HLA クラス I 抗原あるいはクラス II 抗原に対するモノクローナル抗体をそれぞれ固定したビーズに反応させ、ビーズ上に複合体を捕捉します。さらに、標識抗体 (PE 標識 Goat anti human IgG) を反応させると、ビーズに捕捉された抗原抗体複合体に PE 標識抗体が結合します。その蛍光シグナルから、血液細胞に反応する抗 HLA 抗体の存在の有無を判定します。



## 2. 製品内容(キットの構成)

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。

これらの構成試薬は、異なる製造番号の製品の構成試薬と組み合わせて使用しないで下さい。

48 テスト/キット

- ① ビーズミックス.....0.5mL × 1本
- ② 10倍濃度溶血試薬.....9.6mL × 2本
- ③ 10倍濃度洗浄液Ⅰ.....10mL × 1本
- ④ 10倍濃度洗浄液Ⅱ.....30mL × 1本
- ⑤ 10倍濃度 Lysis 液.....1mL × 1本
- ⑥ 10倍濃度PBS.....1mL × 1本
- ⑦ 標識抗体.....50 μL × 1本
- ⑧ 陰性コントロール血清.....1mL × 1本

〔貯蔵方法〕

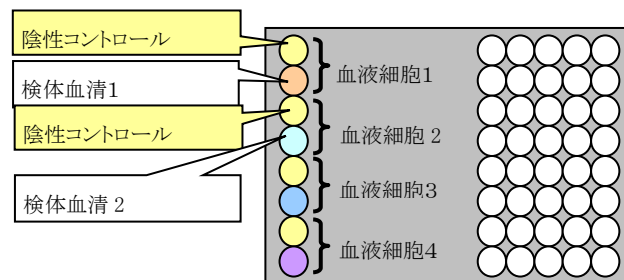
- ・ すべての試薬は2～8℃で保存して下さい。
- ・ ①ビーズミックス、⑦標識抗体は、遮光して保存して下さい。

## 3. 使用手順

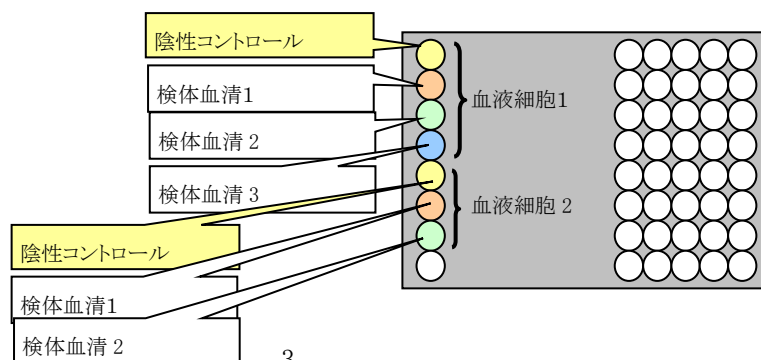
### 3.1 操作上の注意事項

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. 血液或いは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. 本試薬では血液細胞と検体血清中抗 HLA 抗体の反応強度を陰性コントロール血清と比較します。そのため検体毎に陰性コントロール血清を使用する必要があります。下図のような検体レイアウトで測定して下さい。

<血液細胞に1種類の検体血清を反応させる場合>



<血液細胞に複数の検体血清を反応させる場合>



## 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 底及び 96 穴 U 底プレート

■以下のプレートを推奨いたします。

・96 穴 V 底プレート(Thermo Fisher、商品番号#249944)

・マイクロピペット(可変式:1~20  $\mu$ L, 10~200  $\mu$ L, 100~1000  $\mu$ L )

・マルチチャンネルピペット(あると便利)

・連続分注機(あると便利)

・ボルテックスミキサー

・プレートミキサー

・マイクロ遠心機

・マイクロプレート遠心分離機 (2,000 $\times$ gで使用可能なもの)

・37 $^{\circ}$ C恒温水槽



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



マイクロ遠心機



37 $^{\circ}$ C恒温水槽

### (2) 検出と解析

・Luminex システム

・パーソナルコンピュータ



### 3.3 操作方法

#### 3.3.1 準備

##### (1) ビーズの処理

① **ビーズミックス**をボルテックスにより、しっかりと攪拌しておきます。

##### (2) 洗浄液の調製

- 1) ②～⑥の各試薬に析出物がある場合は 37℃以下で加温して溶解し、析出物がなくなったことを確認します。
- 2) ②～⑥の各試薬は 10 倍濃度となっていますので、精製水で 10 倍に希釈して使用します。希釈調製した各試薬は、2～8℃で保存し、1 週間以内に使用して下さい。

#### 3.3.2 操作手順

##### (1) 白血球の分離

※ 以下の操作は、感染防止のため手袋を着用して行って下さい。

##### 〈1.5mL チューブを使用する場合〉

- 1) 1.5mL サンプルチューブに**溶血試薬:500 $\mu$  L**を分注し、37℃恒温水槽で 5 分間加温した後、**EDTA 加全血、ACD 血あるいはヘパリン加血:500 $\mu$  L**を添加します。ボルテックスにより攪拌した後、37℃恒温水槽で、10 分間インキュベートし、溶血反応を行います。陰性コントロール血清用と検体血清用として、1 検体あたり 2 チューブずつ用意します。



- 2) 2,000 $\times$ g で 2 分間遠心分離を行います。
- 3) 溶血していない赤血球が沈殿し、2 層になりますので、上清のみを除去します。
- 4) 37℃に加温した**溶血試薬:1000 $\mu$  L**を添加し、ボルテックスにより攪拌した後、37℃恒温水槽で 10 分間インキュベートし、再度溶血反応を行います。
- 5) 2,000 $\times$ g で 2 分間遠心分離を行います。
- 6) 上清を除去します。
- 7) **洗浄液 I :500 $\mu$  L**を添加します。ボルテックスをして、白血球のペレットを再浮遊させた後、2,000 $\times$ g で 2 分間遠心分離を行います。
- 8) 上清を除去します。
- 9) 7)～8)までの操作を再度行います。

##### 〈分離リンパ球を使用する場合〉

市販の血球分離試薬を用いて調製した分離リンパ球をアッセイに用いることができます。ご使用の血球分離試薬の操作方法に従って分離したリンパ球を  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  cells / チューブに調製してください。

### 参照 1: Lymphoprep™ (STEMCELL Technologies Inc.)を使用したリンパ球分離方法

- 1) EDTA 加全血、ACD 血あるいはヘパリン加血と 0.9%NaCl 水を1:1で混和し、希釈します。
- 2) Lymphoprep™ を新しいチューブに 3mL 添加します。
- 3) 1)で調製した希釈血液 6 mL を Lymphoprep™ が入ったチューブに添加します。この時、希釈血液と Lymphoprep の層が崩れないように慎重に添加します。
- 4) 800×g で 20 分間、室温でスイングローターを用いて遠心します。
- 5) 遠心後は検体と Lymphoprep™ の境界面に明瞭な単核球のバンドが形成されます。バンドをピペットで回収します。
- 6) 回収した画分に 0.9%NaCl 水を加え、250 ×g、10 分間遠心し、上清を除去します。

\* <https://www.stemcell.com/lymphoprep.html>

### 参照 2: RosetteSep + SepMate + Lymphoprep を使用した場合

- 1) EDTA 加全血、ACD 血あるいはヘパリン加血 9 mL に RosetteSep 450 μ L を加えます。  
(50 μL/mL of sample)
- 2) 攪拌して室温で 10 分間静置します。
- 3) PBS を 9mL 加えます。
- 4) SepMate チューブに Lymphoprep を 15mL 分注します。
- 5) SepMate チューブに希釈した検体を添加します。
- 6) 1200×g で 10 分間遠心した検体を添加します。
- 7) 上清を新しいチューブに移します。(デカントで移して構いません。)
- 8) 各チューブに洗浄液 I を 5mL 添加します。
- 9) 300×g で 10 分間遠心し、上清を除去します。
- 10) 8)-9)の操作を 1 回繰り返します。

\* 詳細なプロトコルは各メーカーの情報を参照してください。

### (2) 白血球の抗体感作および可溶化

- 1) 各チューブに **PBS: 60 μ L** を分注した後、ボルテックスにより白血球のペレットを再浮遊させます。
- 2) 該当する各チューブに**⑧陰性コントロール血清: 20 μ L**と**被検血清: 20 μ L**をそれぞれ分注します。
- 3) しっかりフタを閉め、ボルテックスにより攪拌した後、37℃恒温水槽で 30 分間インキュベートします。
- 4) 各チューブに**洗浄液 II : 500 μ L** を添加し、2,000×g で 2 分間遠心分離を行います。
- 5) 上清を除去します。
- 6) 4)~5)までの操作をさらに 2 回、繰り返します。
- 7) 各チューブに**Lysis 液: 50 μ L** を添加します。しっかりフタを閉めた後、25℃、10 分間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、Luminex システムの測定準備をしておきます。

- 8) 10,000×g で **5 分間**遠心分離し、上清を得ます。

### (3) 蛍光ビーズおよび標識抗体の反応

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

- 1) 96 穴 V 底プレートのサンプル数に応じた各ウェルに①**ビーズミックス:5 $\mu$ L**を分注します。



- 2) 各ウェルに (1) で得られた可溶化白血球の上清:25 $\mu$ L を添加します。

■ 上清を採取する場合は、沈殿を巻き込まないように十分注意して下さい。沈殿を一緒にとってしまうと、Luminex 機器の流路が詰まる恐れがあります。

- 3) しっかりシールをした後、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°C、20 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。



- 4) シールに反応液が付着している場合は、隣のウェ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。
- 5) 各ウェルに**洗浄液 II :200 $\mu$ L**を添加し、2,000 $\times$ g で 2 分間遠心分離を行います。

■ 遠心分離を行っている間に、⑦標識抗体を④洗浄液 II で 100 倍に希釈しておきます。



- 6) スナッピングにより上清を除去し、ペーパータオル等で余分な水分を良く吸い取ります。
- 7) ボルテックスをして、蛍光ビーズを再浮遊させます。
- 8) 5)~7)の操作を再度行います。



- 9) 各ウェルに⑦**標識抗体**を**洗浄液 II** で 100 倍に希釈した**標識抗体:50 $\mu$ L**を添加します。



- 10) しっかりシールをした後、遮光して 25℃、10 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。
- 11) 反応液が隣のウェ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。
- 12) 各ウェルに**洗浄液Ⅱ : 200 μ L**を添加し、2,000×g で 2 分間遠心分離を行います。
- 13) スナッピングにより上清を除去し、ペーパータオル等で余分な水分を良く吸い取ります。
- 14) 各ウェルに**洗浄液Ⅱ : 75 μ L**を添加します。ビーズの塊が見える場合は、シールをしてボルテックスにより分散させて下さい。

#### (4)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或いはテンプレートファイルを使用して測定を行います。またその際、Luminex XYP の温度設定が OFF になっていることを確認して下さい。

- 検体をすぐに測定しない場合は、暗所に保管して下さい。



### 3.4 測定結果の解析法

測定結果の CSV ファイルを、「**WAKFlow ICFA 解析ソフトウェア**」で解析します。本ソフトウェアでは、各ビーズの蛍光シグナルからインデックス値を算出し判定します。試薬ご購入の際、無償にてご提供いたします。

## 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・診断・予防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じゅうぶん注意して下さい。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

- ・血液中、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、専用エアで操作して下さい。
- ・陰性コントロール血清は、HbsAg、anti-HIV I&II、anti-HCV、STS、HIV-I RNA および HCV RNA に陰性であることが確かめられています。十分に気をつけてお取り扱い下さい。
- ・使用するピペットおよびチップはエア専用として下さい。
- ・エ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

血液や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》

2～8℃に保存

### 《有効期間》

12 ヶ月（使用期限は外箱に記載）

### 《包装単位》

48 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:「WAKFlow HLA 抗体クラス I & II (ICFA)」-原理および操作概要

