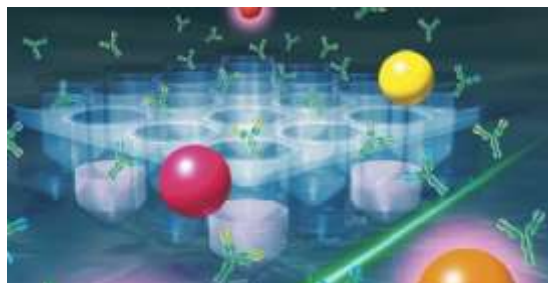


WAKFlow HLA 抗体

スクリーニング検査試薬

操作説明書

—第2版—



2021年3月改訂

2018年8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	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	7
4. 使用上又は取扱い上の注意	9
《貯蔵方法》	9
《有効期間》	9
《包装単位》	9
《お問い合わせ先》	9

別紙

フローシート: **WAKFlow** HLA 抗体スクリーニング検査試薬-原理と操作概要-

1. 測定原理

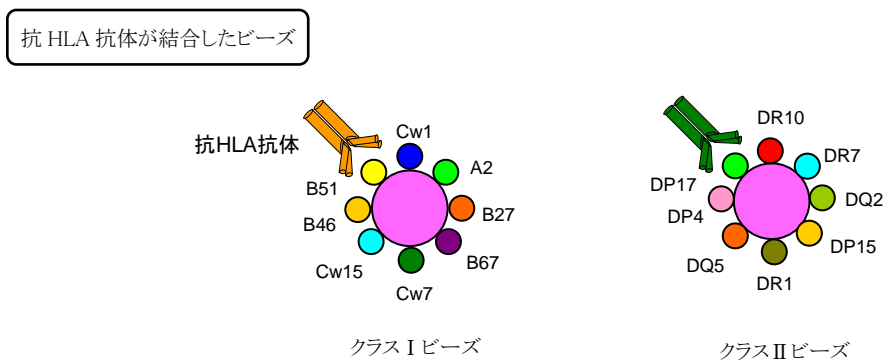
WAKFlow HLA 抗体スクリーニング検査試薬は、ヒト血清中の HLA クラス I およびクラス II 抗原に対する抗体（抗 HLA 抗体）の有無を検査するための研究用試薬です。本製品は Luminex 社 (<http://www.luminexcorp.com>) の xMAP® テクノロジーを用いて検出を行うものです。

操作は以下の 2 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、HLA クラス I あるいは II 抗原（ヒトB細胞株から抽出・精製）が固定された蛍光ビーズと反応させます。

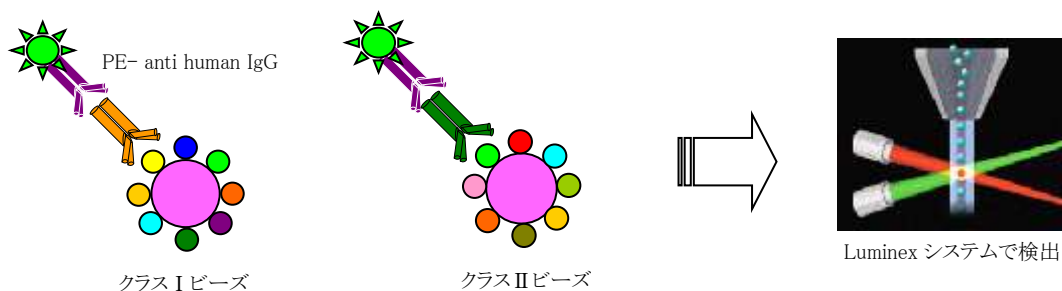
検体血清中に抗 HLA 抗体が存在する場合は、その抗体が反応性を持つ [CREG (Cross REactivity Group) を含む] HLA クラス I または II 抗原が固定されたビーズに結合します。



II) 標識抗体による標識および特異性の検出

血清との反応が終了した蛍光ビーズと標識抗体 (PE 標識 anti human IgG) を反応させると、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る蛍光色素で色分けされていますので、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、蛍光シグナルから、抗 HLA 抗体の有無を決定します。



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下さい。

25 テスト/キット

- ① ビーズミックス.....625 μ L × 1 本
- ② 10 倍濃度洗浄液.....4mL × 1 本
- ③ 標識抗体.....12.5 μ L × 1 本
- ④ 検体処理液.....125 μ L × 1 本

注1) すべての試薬は2~8°Cで保存して下さい。

注2) ①ビーズミックス、および③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. 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 Fisher Scientific、品番: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)

・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)



マイクロピペット



マルチチャンネルピペット



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

(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) 検体血清の前処理

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) 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。

(2) 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。

(3) 洗浄液の調製

1) ② **10 倍濃度洗浄液** 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 **10 倍濃度洗浄液** を精製水で 10 倍に希釈し、**洗浄液** を調製します。なお、操作後の残った洗浄液は、2～8℃ で保存し、1 週間以内に使用して下さい。

(4) Luminex 装置：ウォームアップを行います。

3.3.2 操作手順

(1) 検体血清の処理

1) ④ 検体処理液を十分にボルテックスして、攪拌します。

2) **検体血清 45 μL** と ④ **検体処理液 5 μL** を混和します。

■ 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) 25℃、10 分間以上攪拌します。

* 検体の処理後、壁面などに検体が多く付着している場合、状況に応じて遠心分離(フラッシュもしくは 1,300×g で 1 分間)を行ってください。

(2) ビーズと検体血清の反応

※ 以下の 1)～11) 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) ① **ビーズミックス: 25 μL** を 96 穴 V 底プレートの各ウエルに分注します。



2) これに(1) 検体血清の処理 で調製した **検体血清: 25 μL** を添加します。

- 3) 反応ウェルに隣のウェ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℃、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、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) **洗浄液: 150 μL** を各ウェルに加え、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。



- 6) 各ウェルに**洗浄液: 150 μL** 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。



- 7) 6) の操作を2度繰り返します。

■ この遠心分離の間に、③**標識抗体を洗浄液で 100 倍**に希釈しておきます。

- 8) **希釈した標識抗体: 50 μL** を各ウェルに添加します。
9) しっかりとシールした後、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℃、30 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。
10) 反応後、慎重にシールをはがし、各ウェルに**洗浄液: 150 μL** を加え、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。
11) 各ウェルに**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軽く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。



<非特異反応を示す検体血清の場合>

検体血清によっては、全てのビーズで蛍光シグナルが 1,000 を超える非特異的な反応を示す場合があります。その場合は、解析に支障をきたす恐れがあるため、検体血清と PBS を 1:1 で混合し、再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抗体スクリーニング検査試薬ソフトウェア**」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。

解析は、各ビーズの蛍光シグナルおよびインデックス値で行い、抗HLA抗体の有無を決定します。専用の「**WAKFlow HLA抗体スクリーニング検査試薬ソフトウェア**」は、試薬ご購入の際、無償にて提供いたします。

$$\text{Index (ver1.2)} = \frac{\text{Xpc} - (\text{Npc} - \text{Nbb}) * \frac{\text{Xbb}}{\text{Nbb}}}{\text{Xbb}}$$

「Xpc」; 検体「X」の「ビーズ蛍光値」

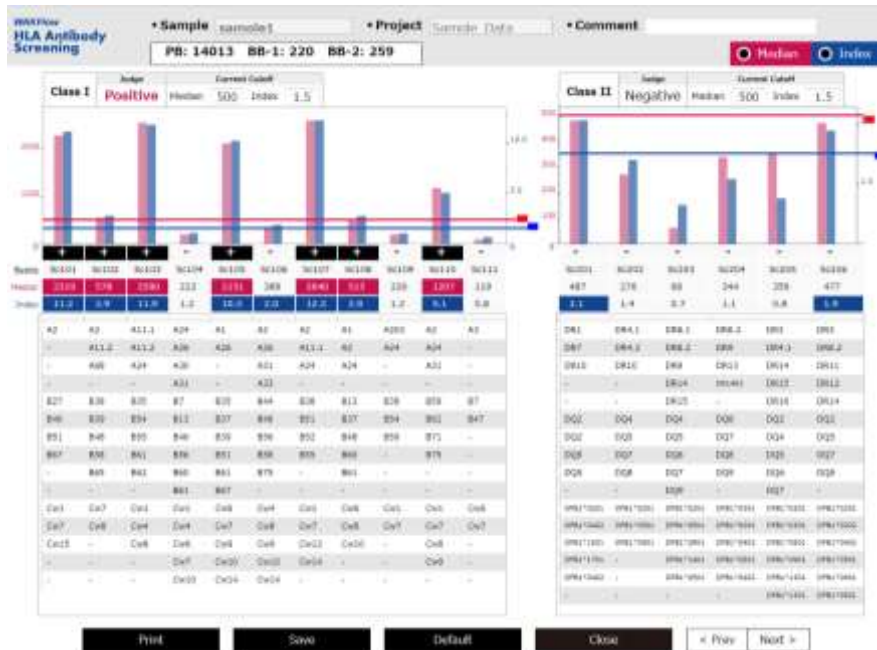
「Xbb」; 検体「X」の「ブランクビーズ (BB) 蛍光値」

「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」

「WAKFlow HLA抗体スクリーニング検査試薬ソフトウェア」

- 本ソフトウェアは、結果が一目で判るようにシンプルなデザインになっています。
- 検体ごとの解析はグラフで見ることができ、視覚的な解析も可能です。
- Windows 7、8 および 10 に対応しております。



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》 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》 25 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/>