

《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》 5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/>

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 サブクラス同定試薬

WAKFlow HLA 抗体 サブクラス同定試薬は、血清中の HLA 抗原に対する抗体(抗 HLA 抗体)の IgG サブクラスを同定するための研究用試薬です。本製品は、Luminex テクノロジー(xMAP®)を用いて検出を行います。

《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、結合した抗 HLA 抗体に対し、Phycoerythrin (PE) 標識抗ヒト IgG1、IgG2、IgG3 および IgG4 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、解析用ファイルを用いて抗 HLA 抗体の IgG サブクラスを同定します。

《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°C保存

- ① ポジティブコントロールビーズ(ポジコンビーズ)・Sub..... 50 µL × 1本
 - ② PE 標識抗ヒト IgG1 抗体..... 25 µL × 1本
 - ③ PE 標識抗ヒト IgG2 抗体..... 25 µL × 1本
 - ④ PE 標識抗ヒト IgG3 抗体..... 25 µL × 1本
 - ⑤ PE 標識抗ヒト IgG4 抗体..... 25 µL × 1本
- 注1) すべての試薬は遮光し、凍結を避け 2~8°C で保存してください。

《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 サブクラス同定試薬 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。
検体ごとにチップを交換してください。

《操作方法》

1. 準備

(1) ビーズの調製

- 1) ①**ポジコンビーズ・Sub** 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 5 ウェルを使用します。**特異性同定試薬のビーズミックス: 125 μL** に ①**ポジコンビーズ・Sub: 10 μL** を添加し、5 秒以上ボルテックスして攪拌します。

(2) 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. 操作手順

(1) 検体血清の処理

- 1) 特異性同定試薬の検体処理液を十分にボルテックスにて攪拌します。

2) **検体血清 135 μL と **特異性同定試薬の検体処理液 15 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取り込まないように注意して上清を取り、反応ウェルに入れてください。

- 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

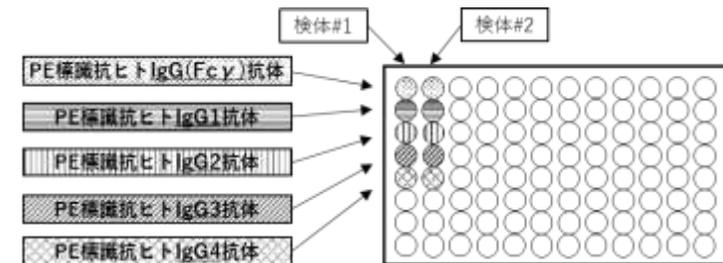
- 1) 96 穴 V 底プレートの各ウェルに 1.準備-(1)で調製した**ビーズミックス: 25 μL** を 5 ウェル(1 検体分)に分注します。なお、アッセイのレイアウトは 3 ページの《アッセイレイアウトの例》をご参照ください。
- 2) 各ウェルに(1)検体血清の処理で調製した**検体血清: 25 μL** を分注します。
- 3) 反応ウェルに隣のウェルの検体が混入しないように隙間なくシールをした後、遮光して 25℃、30 分間攪拌し続けます。
- 4) 反応後、反応液が隣のウェルに混入しないように注意しながら、慎重にシールをはがします。
- 5) 各ウェルに**特異性同定試薬の洗浄液: 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。
- 6) 各ウェルに**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。
- 7) 6) の操作を 2 度繰り返します。この遠心分離の間に各 **PE 標識抗体** を **特異性同定試薬の洗浄液** でそれぞれ **10 倍に希釈** しておきます。**特異性同定試薬の PE 標識抗ヒト IgG(Fcγ) 抗体** は **100 倍に希釈** してください。
- 8) **希釈した 5 種類の標識抗体: 50 μL** を 1 ウェルずつ添加します。
- 9) 隙間なくシールをした後、遮光して 25℃、30 分間攪拌し続けます。

- 10) 反応後、慎重にシールをはがし、各ウェルに**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。
- 11) 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。

《アッセイレイアウトの例》



《測定結果の解析法》

測定結果を「**WAKFlow HLA 抗体サブクラス同定試薬解析ファイル**」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解析用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。