
QCWS 参考プロトコル

抗体検査 (C1qScreen)

平成 29 年度版

作成者

日本組織適合性学会 認定制度委員会 ワーキンググループ

抗 HLA 抗体 WG

改訂履歴

| 版数 | 改訂日 | 改訂理由 | 改訂内容 | 改訂責任者 |
|----|-----|------|------|-------|
| | 施行日 | | | |
| 2 | | | | |

目 次

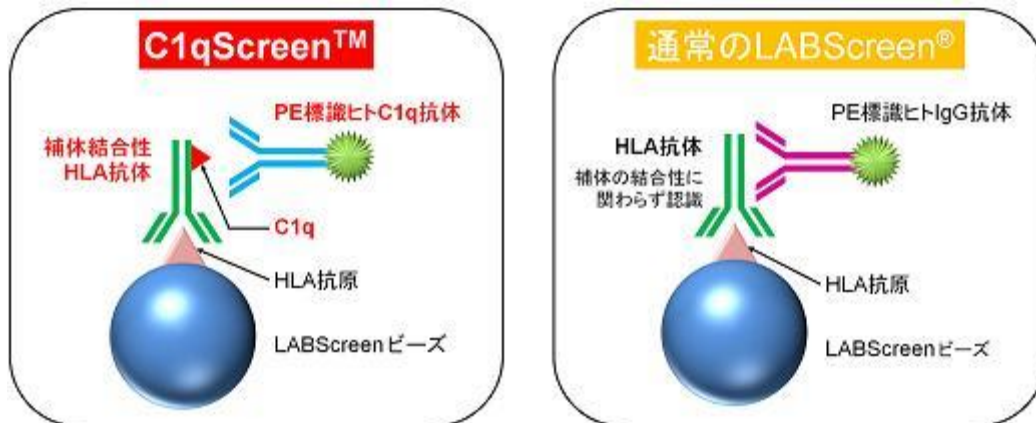
| | |
|-------------------------------|---|
| 1. C1qScreen 製品概要 | 1 |
| 1. 1 C1qScreen の使用目的・原理 | 1 |
| 1. 2 操作の流れ | 2 |
| 2. 検査の準備 | 3 |
| 2. 1 検査機器の準備・キット内容・検体処理 | 3 |
| 2. 2 サンプルの種類 | 4 |
| 3 検査の手順 | 4 |
| 3. 1 操作上の注意点 | 4 |
| 3. 2 操作方法 | 4 |

1. C1qScreen 製品概要

1. 1 C1qScreen の使用目的・原理

C1qScreen は、Luminex と LABScreen を使用して血清中の HLA 抗体を検出する為の研究用試薬で、高感度に補体依存性 HLA 抗体を検出する事ができる。

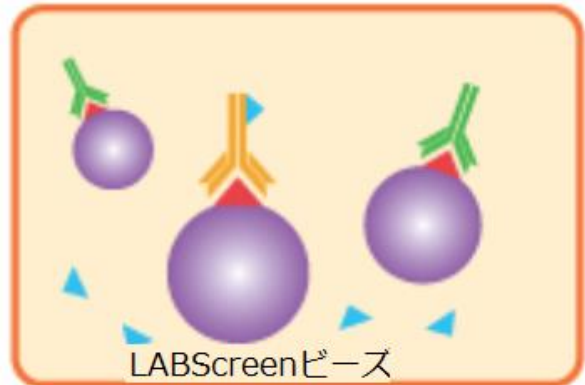
C1q とサンプルと LABScreen Single Antigen を反応させ、C1q が結合した HLA 抗体のみを、PE 標識ヒト C1q 抗体で染色し、Luminex で蛍光値を測定し、補体依存性抗体とその特異性の検出を行う事ができる。



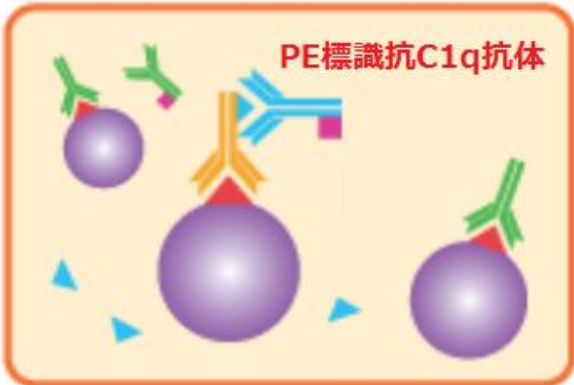
1. 2 操作の流れ



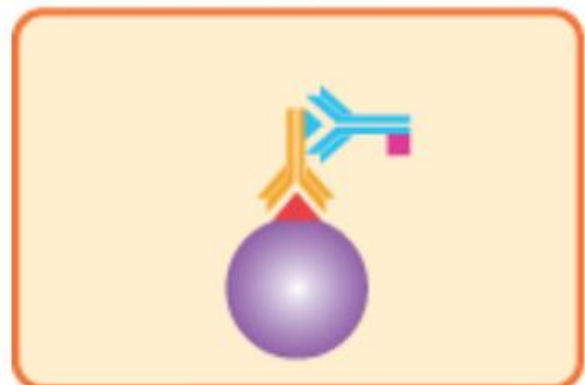
1. 非働化したサンプル血清とC1qを混合



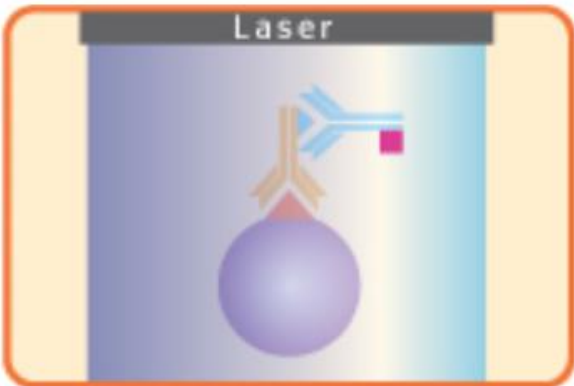
2. LABScreenビーズと1.を混合し、20分反応



3. 抗C1q二次抗体を加え、室温で20分反応



4. PBSで洗浄 (1回のみ)



5. LABScanシステムで測定



2. 検査の準備

2. 1 検査機器の準備・キット内容・検体処理

2. 1. 1 検査器具・資材の準備

| | |
|-------|------------------------|
| 機器 | 名称 |
| | Luminex |
| | プレート遠心機 (回転数 1300g 以上) |
| | プレートシェーカー |
| 器具・資材 | 96 ウェル マイクロプレート |
| | トレーシール |
| | ピペット、チップ等 |

2. 1. 2 キット内容と保存方法

| コード* | 製品名 | 容量 | 保存温度 |
|-----------|----------------------------|---------|---|
| PEPC1Q | Clq | 25 uL | 超冷凍 (-65°C) |
| PEPAC1Q | PE-labeled anti-Clq | 125 uL | 超冷凍 (-65°C) /2-8°C (再凍結不可) |
| PEPC1QPCB | Clq positive control beads | 12.5 uL | 超冷凍 (-65°C) /2-8°C (再凍結不可) 解凍後は3ヶ月以内に使用 |
| HEPBUF | HEPES buffer | 100 uL | 超冷凍 (-65°C) /2-8°C |

2. 1. 3 キット以外に必要な試薬・機器：

測定機器：Luminex、その他周辺試薬

測定用プレート：UNIPLATE (Whatman 7701-3250 (white)) を推奨

トレーシール

その他機器：プレートシェーカー、ボルテックス、プレート遠心機 (メーカー不問)

LABScreen 製品：LABScreen Single Antigen Class I (LS1A04)、Class II (LS2A01) 等。

PBS (-)：pH7.4、Ca²⁺、Mg²⁺を含まないもの。

2.1.4 コントロール製品

| 商品コード | 製品名 | 容量 | 保存温度 |
|----------|-------------------------------------|-------------------|-------------|
| C1QS-NC | C1qScreen Negative Control Serum | 100uL (20test) | 超冷凍 (-65°C) |
| C1QS-PC1 | C1qScreen Class I Positive Control | | 超冷凍 (-65°C) |
| C1QS-PC2 | C1qScreen Class II Positive Control | | 超冷凍 (-65°C) |

カットオフの検討には、陰性コントロール血清 C1Q-NC 及び予め特異性の分かっている陽性サンプルを使用する。陽性コントロールは、二次抗体 (PEPAC1Q) が問題ない事を確認するために使用する。

2. 2 サンプルの種類 :

ヒト血清のみ。血漿及び溶血した血液は使用不可

3 検査の手順

3. 1 操作上の注意点 :

補体 (C1q : PEPC1Q) は温度の影響を受けて失活しやすい成分なので、取り扱いには以下の点に十分注意する。

使用直前まで超冷凍で保存しておく。使用する直前に C1q (PEPC1Q) を室温で 5-10 分程度融解させる。

およそ融解している事を確認したら氷上に置き (多少、氷の粒が残っている程度)、使用する分量を計算して (分量は、操作方法 2 (イ) を参照)、空のチューブに分注する。残りの使用しない C1q は、適当な容量に小分け分注する。

使用する分は、氷上に置いておく。使用しない分はすぐに超冷凍で再凍結させる。(有効期限まで使用可能。)

3. 2 操作方法 :

1. 血清の非動化

(ア) 1.5 mL チューブに 40 uL の血清を加え、56 度 30 分で反応する。

(イ) 8000-10000g で 10 分間遠心し、上清 30 uL を別の新しいチューブに移し、氷上に置いておく。

2. 多検体テストする場合 (少数検体の場合はスキップ) : 全て 10% 余分に予め調整する。調整後の各溶液は氷上に置いておく。

(ア) LABScreen ビーズに Positive Control ビーズを 10:1 の割合で加える。

| テスト数 | LABScreen ビーズ (uL) | Positive Control ビーズ (uL) | 計 (uL) |
|------|--------------------|---------------------------|----------|
| 4 | 22 | 2.2 | 24.2 |
| 5 | 27.5 | 2.75 | 30.25 |
| 6 | 33.3 | 3.33 | 36.63 |
| ... | ... | ... | ... |
| N | 5.5 x N | 0.55 x N | 6.05 x N |

(イ) 溶かしておいた C1q (PEPC1Q) を HEPES Buffer で 5 倍希釈する。必要量は下記の表を参照する。希釈後は氷上に置いておく。

| テスト数 | C1q (uL) | HEPES Buffer (uL) | 計 (uL) |
|------|----------|-------------------|--------|
| 4 | 4.4 | 17.6 | 22 |
| 5 | 5.5 | 22 | 27.5 |
| 6 | 6.6 | 26.4 | 33 |
| ... | ... | ... | ... |
| N | 1.1 x N | 4.4 x N | 5.5 N |

3. 血清と C1q の混合

(ア) 非動化した各血清サンプルを各ウェルに 5 uL 分注する。

* オプションで、陰性/陽性コントロール血清を使用することも可能。(1 ページ参照)
なお、コントロール血清は、非動化処理は必要ない。

(イ) 2. (イ) で予め 5 倍希釈した C1q を各ウェルに 5uL 分注する。(少数検体の場合は、各ウェルに HEPES Buffer を 4uL、C1q を 1uL ずつそれぞれ加える。)

4. 2 (ア) で調整したビーズミックスを 5 uL ずつ各ウェルに追加する。(少数検体の場合は、LABScreen ビーズ 4.5uL と、Positive Control ビーズ 0.5uL を各ウェルにそれぞれ追加する。)
5. シールを張ってボルテックスし、室温で 20 分間、振とうしながら遮光反応する。
6. PE conjugated anti-C1q (PEPAC1Q) を各ウェルに 5uL 加えトレーシールをし、ボルテックスする。(洗淨せずに、二次抗体を直接加える。また、二次抗体は希釈しない。)
7. 室温で 20 分間、振とうしながら遮光反応する。
8. トレーシールをはがし、80 uL の PBS を各ウェルに入れ、1300g で 5 分間 又は 1500g で 3 分間遠心する。
9. フリッキングし、上清を除去する。(ドライボルテックスは行いません。)
10. 80 uL の PBS を各ウェルに加え、しっかりとピペッティングで攪拌する。
11. その後、LABScan システム (Luminex) で蛍光値を測定する。
12. 得られた測定データ (バッチ名.csv ファイル) は、HLA Fusion で測定する。