
QCWS 参考プロトコル

HLA 抗原検査

PCR-SBT

(Polymerase Chain Reaction - Sequencing Based Typing)

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

HLA タイピング 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. 検体の準備 (QIAamp DNA Blood Mini kit)	1
1.1 検査機器の準備.....	1
1.2 試薬の準備.....	1
1.3 DNA 抽出	1
1.3.1 全血から DNA 抽出.....	1
2. SBT タイピング	3
2.1 検査器具・資材の準備.....	3
2.2 PCR 増幅	5
2.3 PCR 産物の精製	6
2.4 シークエンシング反応.....	6
2.5 シークエンシング反応産物の精製.....	7
2.5.1 エタノール沈殿による精製.....	7
2.5.2 セファデックスによる精製.....	8
2.6 DNA シークエンサーによる電気泳動	9
2.6.1 サンプル調整.....	9
2.6.2 サンプルシートの作成.....	10
2.6.3 電気泳動.....	10
2.7 解析.....	10
2.7.1 Assign-SBT (Conexio Genomics)解析ソフト.....	10
2.7.2 SBTengine (Amersham)解析ソフト.....	11

1. 検体の準備 (QIAamp DNA Blood Mini kit)

1.1 検査機器の準備

機器	<ul style="list-style-type: none"> ・ 遠心分離器 (1.5mlTube 用) ・ ウォーターバスまたはヒートブロック ・ ボルテックスミキサー
試薬・器具	<ul style="list-style-type: none"> ・ QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN/Cat No. 51104 または 51106) ・ エタノール (96~100%) ・ 1.5ml マイクロチューブ

(1) ウォーターバスまたはヒートブロックを 56℃に加熱する。

(2) 遠心分離器を 15~25℃に設定する。

1.2 試薬の準備

(1) Buffer AW1 のボトルにエタノール (96~100%) 125 ml を添加し、全量 220 ml に調整する。ボトルキャップのチェックボックスにチェックを入れ、調整日を記載する。

(2) Buffer AW2 のボトルにエタノール (96~100%) 160 ml を添加し、全量 226 ml に調整する。ボトルキャップのチェックボックスにチェックを入れ、調整日を記載する。

(3) QIAGEN Protease (茶瓶、乾燥タブレット) の中に、protease solvent を全量 (1.2 ml または 5.5 ml) 加える。

※QIAamp DNA Blood Mini Kit (50) (51104) には、1.2 ml protease solvent、QIAamp DNA Blood Mini Kit (250) (51106) には 5.5 ml protease solvent が付属している。

(4) Buffer AL 中に沈殿物がある場合には 56℃で溶解する。

1.3 DNA 抽出

1.3.1 全血から DNA 抽出

(1) 1.5 ml マイクロチューブの底に調整した QIAGEN Protease 20 μ L を加える。

(2) 良く転倒混和した全血 200 μ L を添加する。

※サンプル量が 200 μ L 以下の場合には PBS で 200 μ L に調製する。

(3) Buffer AL200 μ L を添加する。

※ QIAGEN Protease を Buffer AL に直接添加しない事。

(4) ボルテックスミキサーで 15 秒間混和する。

(5) 56°C で 10 分間インキュベートし、数秒スピンドウンする。

(6) エタノール (96 ~ 100%) 200 μ L を添加し、15 秒間ボルテックス、スピンドウンする。

(7) QIAamp Mini Spin Column (2 ml チューブ中) に、(6) の混合液をアプライする。

(8) 6,000 x g (8,000 rpm)、1 分間遠心する

(9) QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml チューブ (付属品) に移す。

(10) Buffer AW1500 μ L を (9) の Column に加える。

(11) 6,000 x g (8,000 rpm)、1 分間遠心する

(12) QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml チューブ (付属品) に移す。

(13) Buffer AW2 500 μ L を、Column に加える。

(14) 最高速度 20,000 x g (14,000 rpm)、3 分間遠心する。

(15) QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml チューブ (付属品) に移す。

(16) 最高速度 20,000 x g (14,000 rpm)、1 分間遠心する。(カラムに残った Buffer を完全に除く為)

(17) QIAamp Mini Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。

(18) 200 μ L の Buffer AE あるいは精製水を加える。

(19) 室温 (15 ~25°C) で 5 分間インキュベートする。

(20) 6,000 x g (8,000 rpm)、1 分間遠心し、DNA を溶出する。

(21) 1.5 ml チューブに回収された DNA の濃度を測定する。

※ヒト全血 200 μ L (約 5 x 10⁶ 白血球/ml) のサンプルから 200 μ L の水で溶出した場合、DNA 6 μ g (30 ng/ μ L) が通常得られる。

(22) 20 ng/ μ L に調整する。

2. SBT タイピング

2.1 検査器具・資材の準備

機器	<ul style="list-style-type: none"> • DNA シークエンサー：ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer など • サーマルサイクラー：GeneAmp® PCR System 9700 (ABI) など • ボルテックスミキサー • 遠心分離器 (1.5ml チューブ対応機および 96 ウェルプレート対応機) 																																
試薬・器具	<ul style="list-style-type: none"> • タイピングキット： Allele SEQR HLA Typing Kits (CELERA) <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Typing Kits</th> <th>REF</th> <th>No of Tests</th> <th>Target exon</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>HLA-A</td> <td>7K38-01</td> <td>25</td> <td>ex2, 3, 4</td> </tr> <tr> <td>HLA-B</td> <td>7K39-01</td> <td>25</td> <td>ex2, 3, 4</td> </tr> <tr> <td>HLA-C</td> <td>7K40-03</td> <td>25</td> <td>ex2, 3, 4</td> </tr> <tr> <td>HLA-DRB1</td> <td>7K41-01</td> <td>25</td> <td>ex2</td> </tr> <tr> <td>HLA-DRB1</td> <td>7K38-01</td> <td>100</td> <td>ex2</td> </tr> <tr> <td>HLA-DQB1</td> <td>7K42-01</td> <td>25</td> <td>ex2, 3</td> </tr> <tr> <td>HLA-DPB1</td> <td>7K43-01</td> <td>25</td> <td>ex2</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> • 1.5 ml マイクロチューブ • PCR 反応チューブ (8 連チューブ、96 ウェルプレート など) • 96 ウェルプレート (DNA シークエンサー対応) • Hi-Di™ Formamide (4311320/ABI) <p><u>エタノール沈殿で精製を行う場合</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • エタノール (96~100%) • 80%エタノール 	Typing Kits	REF	No of Tests	Target exon	HLA-A	7K38-01	25	ex2, 3, 4	HLA-B	7K39-01	25	ex2, 3, 4	HLA-C	7K40-03	25	ex2, 3, 4	HLA-DRB1	7K41-01	25	ex2	HLA-DRB1	7K38-01	100	ex2	HLA-DQB1	7K42-01	25	ex2, 3	HLA-DPB1	7K43-01	25	ex2
Typing Kits	REF	No of Tests	Target exon																														
HLA-A	7K38-01	25	ex2, 3, 4																														
HLA-B	7K39-01	25	ex2, 3, 4																														
HLA-C	7K40-03	25	ex2, 3, 4																														
HLA-DRB1	7K41-01	25	ex2																														
HLA-DRB1	7K38-01	100	ex2																														
HLA-DQB1	7K42-01	25	ex2, 3																														
HLA-DPB1	7K43-01	25	ex2																														

MultiScreen システムで精製を行う場合

- Sephadex G-50 Superfine(17-0041-01/GE Healthcare)
- MultiScreen HV plates (MAHVN4550/Millipore)
- MultiScreen column loader 45 μ L (MACL09645/Millipore)
- MultiScreen Centrifuge Alignment Frame (MACF09604/Millipore)
- レシーバープレート (96 ウェルプレートなら何でも可 : MDCPN2M50 など)
- 滅菌水
- Tris-BPB 液 (50mM Tris-HCl (PH8) ・ 1%BPB)

2.2 PCR 増幅

(1) 検体数分の PCR Pre-mix と Ampli Taq Gold 混合反応液を以下の分量で調整する。

HLA-A, -B, -C		
反応数	PCR Premix	AmpliTaq Gold
1	16 μ L	0.3 μ L
5	80 μ L	1.5 μ L
10	160 μ L	3.0 μ L
25	400 μ L	7.5 μ L

HLA-DRB1, -DPB1, DQB1		
反応数	PCR Premix	AmpliTaq Gold
1	8 μ L	0.1 μ L
10	80 μ L	1.0 μ L
25	200 μ L	2.5 μ L
100	800 μ L	10 μ L

(2) PCR チューブに調整した反応液を以下の分量分注する。

HLA-A, -B, -C 16 μ L

HLA-DRB1, -DPB1, -DQB1 8 μ L

(3) DNA (20 ng/ μ L) 又は滅菌蒸留水 (陰性コントロールチューブ) を以下の分量各 well へ添加する。

HLA-A, -B, -C 4 μ L

HLA-DRB1, -DPB1, -DQB1 2 μ L

(4) スピンドアウン (5 秒) する。

(5) サーマルサイクラーに PCR チューブをセットし、以下の条件で PCR 反応を行う。

Cycle	Temperature	Time
1	95°C	10 分
	96°C	20 秒
36	60°C	30 秒
	72°C	3 分
1	4°C	∞

(6) 必要に応じて、PCR 産物の 1.5 μ L 程度を電気泳動し、増幅サイズを確認する。

遺伝子名	増幅産物数	増幅領域	増幅サイズ
HLA-A	1	exon 1 - exon 4	2 kb
HLA-B	2	exon 2 - exon 3	1.2 kb
		exon 4 - exon 7	1.5 kb
HLA-C	2	exon 1 - exon 3	1.3 kb
		exon 4 - exon 7	1.5 kb
HLA-DRB1	1	exon 2	500-700 bp
HLA-DQB1 (QX2 PCR)	1	exon 2	300 bp
HLA-DQB1 (QX3 PCR)	1	exon 3	350 bp
HLA-DPB1	1	exon 2	300 bp

2.3 PCR 産物の精製

- (1) 各 PCR 産物に PCR Cleanup Reagent (Exonuclease I) 3 μ L を添加する。
- (2) 軽くボルテックスし、スピンドウンする。
- (3) サーマルサイクラーにて以下の条件で加熱する。

Cycle	Temperature	Time
1	37°C	15 分
	80°C	15 分
1	4°C	∞

- (4) HLA-DRB1, -DPB1, -DQB1 の PCR 産物は滅菌蒸留水または TE で 3 倍希釈する。

PCR 産物	10 μ L
滅菌蒸留水または TE	20 μ L

2.4 シークエンシング反応

- (1) 新しい 96 ウェルプレート (DNA シークエンサー対応) に必要なローカスの Sequencing mix を 8 μ L ずつ分注する。

CLASS I			CLASS II		
A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
AX2F	BX2F	CX2F	Exon 2F	Exon 2F	Exon 2F
AX2R	BX2R	CX2R	Exon 2R	Exon 2R	Exon 2R
AX3F	BX3F	CX3F	Codon 86	Exon 3F	Codon 85

AX3R	BX3R	CX3R		Exon 3R	
AX4F	BX4F	CX4F			
AX4R	BX4R	CX4R			

参考 1) HLA-A のタイピングを行う場合は、96 ウェルプレート の 6well を使用し、AX2F から AX4R の 6 種の Sequencing mix 8 μ L を 1 ウェルずつ分注していく。

(2) PCR Cleanup Reagent で精製した PCR 産物を 2 μ L ずつ添加する。

参考 2) 参考 1 で用意した 6 種 Sequencing mix がそれぞれ入った 6 ウェル全てに同じ精製 PCR 産物を 2 μ L ずつ添加する。

(3) スピンドアウンをする。

(4) サーマルサイクラーを用いて、以下の条件でシーケンシング反応を行う。

Cycle	Temperature	Time
	96 °C	20 秒
25	50 °C	30 秒
	60°C	2 分
1	4°C	∞

2.5 シーケンシング反応産物の精製

2.5.1 エタノール沈殿による精製

(1) シーケンシング反応チューブに 2 μ L NAOAc/EDTA Buffer を添加する。

(2) 500 xg で 30 秒でスピンドアウンする。

(3) エタノール (96~100%) 25 μ L を添加する。

(4) ボルテックスミキサーで 15 秒間激しく攪拌する。

※要注意:必ず激しい攪拌を行うこと!! 攪拌不足はシーケンスデータに影響を及ぼす。

(5) 2000 x g、30 分遠心する。

-
- (6) 96 ウェルプレート逆さまにし、ペーパータオルに軽く叩き上清液を軽く取り除く。
 - (7) そのままの逆さまの状態にペーパータオルにのせたまま、遠心 (50-100 xg 10 秒) し、上清液を完全に除去する。
 - (8) 80% エタノール 50 μ L を添加する。
 - (9) 2000 x g、5 分遠心する。
 - (10) 再び(6)-(7)を行う。

2.5.2 セファデックスによる精製

- (1) MultiScreen column loader 上に、Sephadex G-50 Superfine 粉末を適量のせ、プラスチックプレートを用いて 96 ウェルに充填する。

Merck Millipore のホームページから抜粋



- (2) MultiScreen column loader を机上に数回叩き、ウェル上部に隙間が出来るか確認する。隙間が出来た場合は、更に Sephadex G-50 Superfine を充填し、擦り切り一杯詰める。
- (3) MultiScreen column loader 上に、MultiScreen HV プレート逆さまに置き、loader の突起にプレートが接するようにする。
- (4) loader とプレートがずれないように回転させ、プレートが下に来るようにする。
- (5) loader の裏側や側面を叩くか、プレートと Loader を机に数回軽く叩きつけることで、充填した Sephadex をプレートのウェルに移す。
- (6) Sephadex を移したプレートの各ウェルに、滅菌水 300 μ L を加える。
- (7) 室温で 2~3 時間放置する。

-
- (8) MultiScreen Centrifuge Alignment Frame を装着したレシーバープレート上に HV プレートを固定し、2,800rpm で 3 分遠心する。
 - (9) レシーバープレートの廃液を捨て、再度 HV プレートにはめる。
 - (10) HV プレートの各ウェルに、蒸留水 150 μ L を加え、2,800rpm で 3 分遠心する。
 - (11) HV プレートを DNA シークエンサ対応の 96 ウェルプレートの上へのせる。
 - (12) 必要に応じて、Tris-BPB 液の 100 倍希釈液 2 μ L を、シークエンス反応液に添加する。
(HV プレートにアプライする際の目印として加える。必須ではない)
 - (13) シークエンス反応液の全量を HV プレートの各ウェルにアプライする。
※このとき、各ウェルのジェル状 Sephadex の中央にアプライすること。
 - (14) 2,800rpm で 3 分遠心する。
 - (15) 回収量を確認し、ウェル毎の回収量にバラツキがある場合は、プレートの向きを変えてもう一度遠心する。
 - (16) 70°C ∞ に設定したサーマルサイクラーに 96 ウェルプレートをセットし、ペーパータオルをのせ、サーマルサイクラーのフタを開けたまま 20 分程度放置し、乾燥させる。

2.6 DNA シークエンサーによる電気泳動

2.6.1 サンプル調整

- (1) 2.5 で精製乾燥させたシーケンシング反応産物に 10~15 μ L Hi-Di™ Formamide を加える。
- (2) スピンドウンする。
- (3) サーマルサイクラーで、95°C、2 分間加熱変性させる。
- (4) 直ちに氷上で 3 分冷却する。

2.6.2 サンプルシートの作成

Assign-SBT (Conexio Genomics) または SBTengine (Amersham) 解析ソフトを使用する場合

サンプル名_A2F のように、サンプル名の後にアンダーバーとローカスとプライマー情報を加える。

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1
Exon 2 Forward	_A2F	_B2F	_C2F	_DRBF
Exon 2 Reverse	_A2R	_B2R	_C2R	_DRBR
Codon				_DRB_GTG

2.6.3 電気泳動

Mobility File や Run Modules は、以下を参考に設定する。

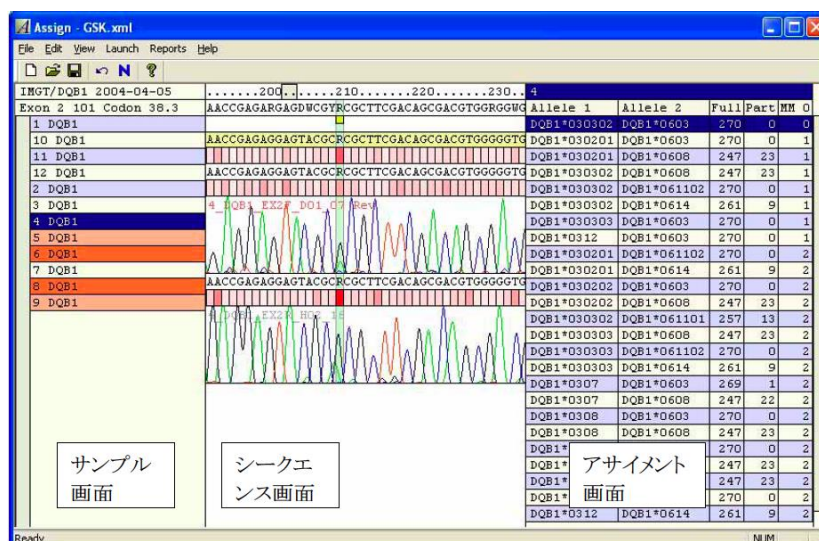
Instrument	Mobility file	Run Module	Injection Parameters	Collection Parameters
ABI 3100	DT3100POP6 (BD)v2 Mobility	RapidSeq36_POP6_Default	1.0-1.5kV, 5-10 秒	Collect for 1800 seconds
ABI 3730	KB_3730_POP7_BDTv1.mob	RapidSeq36_POP7_Default	1.0-1.5kV, 5-10 秒	Collect for 1800 seconds

2.7 解析

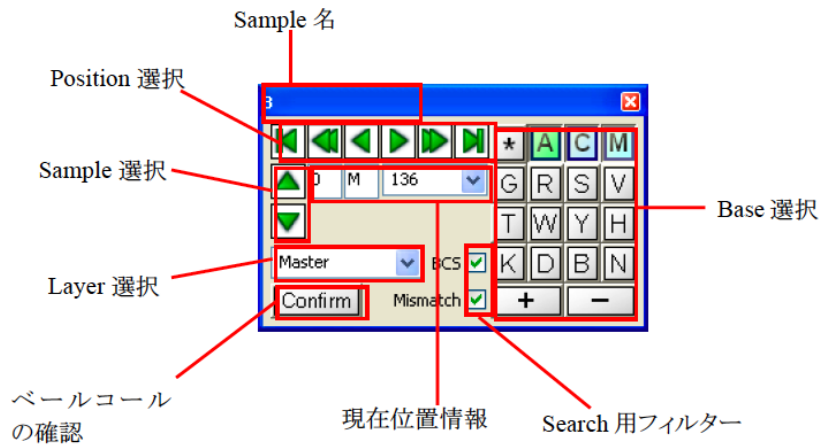
2.7.1 Assign-SBT (Conexio Genomics) 解析ソフト

(1) File で Import を選択する。ファイルを選択してインポートする場合は、「selected file」、フォルダごとインポートする場合は、「Directory」を選択する。

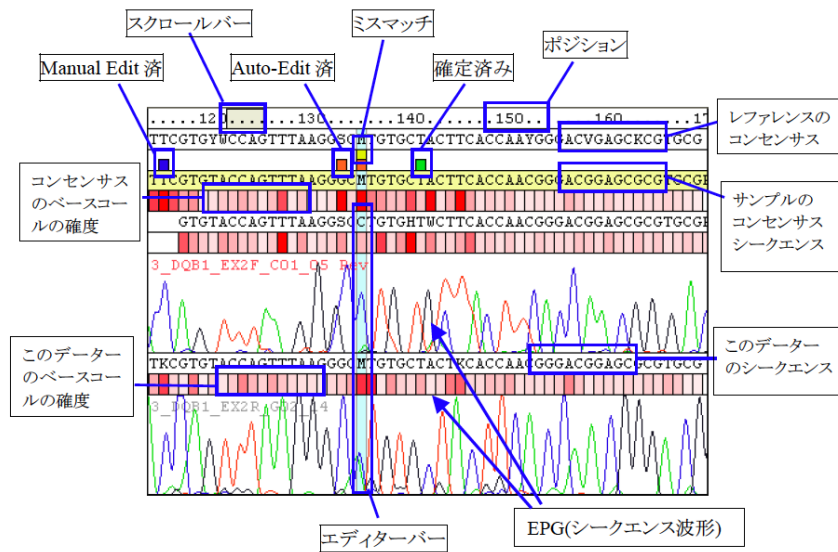
(2) 左側のサンプル画面で、各検体名を順にクリックし、右側のアサイメント画面でタイピング結果を確認する。



- (3) Menu の Launch/Navigator を選択する。または、Tool bar から N を選択してナビゲーターを起動する。



- (4) ナビゲーターを用いて、シーケンス画面のピークを確認し、必要に応じてシーケンスを修正する。



- (5) Menu の Reports/Report Generator を選択し、レポートを作成する。

- (6) File で Save as を選択し、project に名前をつけ、保存する。

2.7.2 SBTengine (Amersham)解析ソフト

注意点：ローデータは書き換えられてしまうため、コピーを作成しておくが良い。

- (1) Sample Management タブで、解析したい Sequence file フォルダを選択する。

(2) Sequence Overview タブを選択する。

The screenshot shows the SBTengine software interface. At the top, there is a gene map with exons 1 through 6. Below it, a sequence alignment view shows three chromatograms for different samples. On the right side, there is a table of HLA-DRB1 alleles with columns for Pos, Allele, Exon, Invariant, Genotypes, and Freq. Callouts point to various parts of the interface: 'プルダウンメニュー' (pull-down menu) points to the 'Search Genes' dropdown; 'ミスマッチ確認画面' (mismatch confirmation screen) points to the 'Shown' dropdown; 'タイピング結果画面' (typing result screen) points to the 'Allele assignments' section; and 'シークエンス画面' (sequence screen) points to the chromatogram area.

(3) プルダウンメニューから解析をしたい検体とローカスを選択する。

(4) ミスマッチ確認画面下の「Shown」は「Inconsistencies [I,E)」を選択する。

(5) シークエンス画面で波形を確認していく。間違っている場合は、正しい塩基を打ち込み、Enter キーで次の[I,E]ポジションにジャンプする。

(6) 全て終わると、「Shown」が「Crucial positions」に変わる。

(7) 再度ミスマッチ確認画面を上から順にクリックまたは↓キーでベースコールを確認していく。

(8) 確認・編集が終了したら、右下の「Approve」を押す。

(9) 「Typing Result」タブを押して、レポートを表示させる。

(10) 「Save」ボタンで保存をし、「Print」ボタンでプリントが出来る。

6. 様式の記載項目

様式は以下の記載項目に従い各施設で書式を規定し、運用すること（以下は様式の記載項目一覧）。なお、必要に応じて記載項目を追加することは可とする。

様式-CBC006-01（版数 3）

受領記録

1. 受領日時
2. 採取医療機関名
3. 荷姿の確認
4. 加冷・加温の確認
5. 原料臍帯血の受入本数
6. 母体血検体の受入本数
7. さい帯血提供の同意書の枚数
8. 分娩の記録の枚数
9. 家族歴調査書の枚数
10. 問診票の枚数
11. 調製保存責任者の確認
12. 備考

様式-CBC006-2（版数 3）

受入作業記録

1. 臍帯血管理番号
2. 受領日時
3. 採取医療機関名
4. 臍帯血管理番号の確認 : 確認・未確認* ¹ （欠如品）
5. 血液バッグ 製造番号/有効期限* ²
6. 母体血検体用試験管 製造番号/有効期限* ²
7. セグメント臍帯血管理番号の確認
8. 有核細胞数
9. 臍帯血重量 : (g)
10. 臍帯血容量 : (mL)
11. 原料臍帯血の外観による適否 : 適・否
12. 臍帯血関連情報による適否* ³ : 適・要確認・否
13. 採取から受入までの経過時間による適否 (<u>33</u> * ⁴ 時間以内) : 適・否
14. 有核細胞数による適否 (11.4×10^8 個以上) : 適・否
15. その他の理由 () による適否 : 適・否
16. 備考
17. 調製保存責任者の確認
18. 情報入力の確認

* 1 : 括弧内に欠如しているものを記入し、臍帯血関連書類又は母体血検体に欠如があった場合は「未確認」とし、次工程に進めることを可とする。

* 2 : 調製開始の適否が「否」の場合は未記入(斜線処理)でも可とする。

* 3 : 情報の欠如は「要確認」に、情報内容による調製開始不適は「否」とする。

* 4 : 採取から凍結開始までが 36 時間以内になるよう設定する。

