
QCWS 参考プロトコル

抗HLA 抗体検査 (C1qScreen)

2019 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

制定・改訂履歴

版数	制定日	制定理由	作成 責任者
	施行日		
初版		日本組織適合性学会が開催する QCWS での HLA 検査を実施する際に用いる QCWS 参考プロトコルとして制定した。	WG

版数	改訂日	改訂理由	改訂内容	改訂 責任者
	施行日			
2	2019年9月1日	表記の統一	「HLA 抗体」を「抗 HLA 抗体」の表記へ変更	WG

目 次

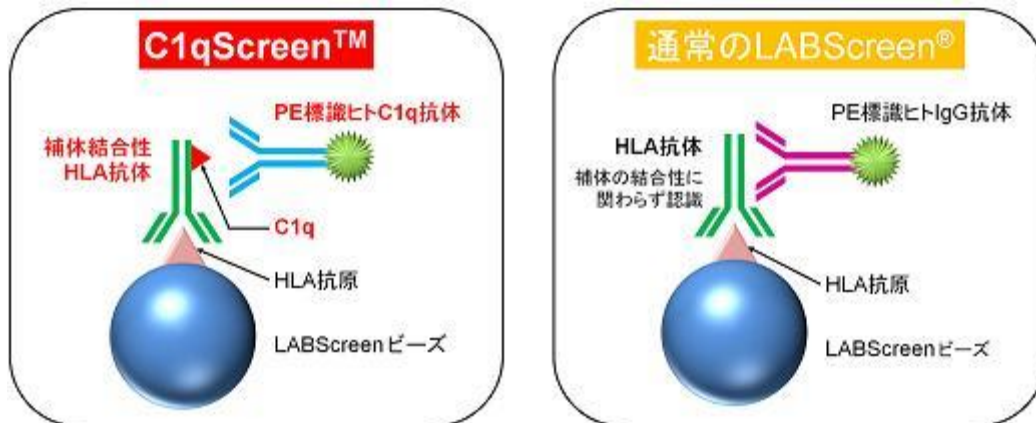
1. ClqScreen 製品概要	1
1. 1 ClqScreen の使用目的・原理	1
1. 2 操作の流れ	2
2. 検査の準備	3
2. 1 検査機器の準備・キット内容・検体処理	3
2. 2 サンプルの種類 :	4
3 検査の手順	4
3. 1 操作上の注意点 :	4
3. 2 操作方法 :	4

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抗 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抗 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 が結合した抗 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。

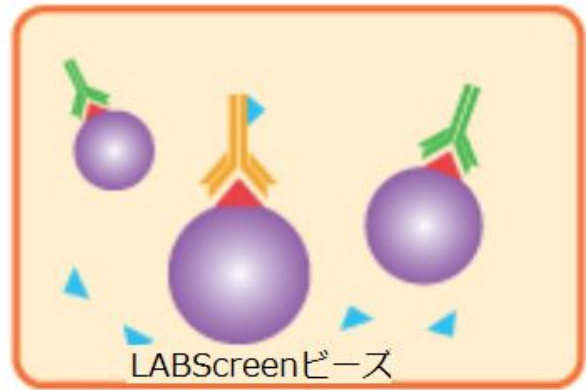


※本図における「HLA 抗体」とは「抗 HLA 抗体」の事を示す

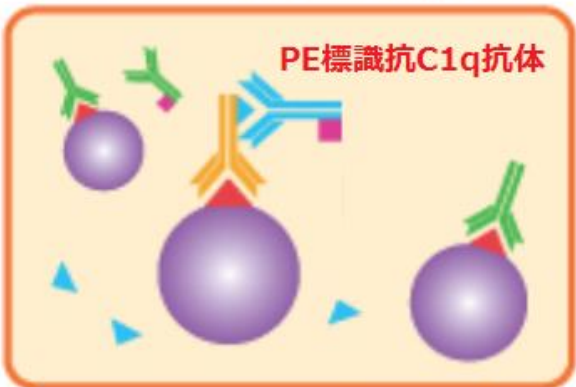
1. 2 操作の流れ



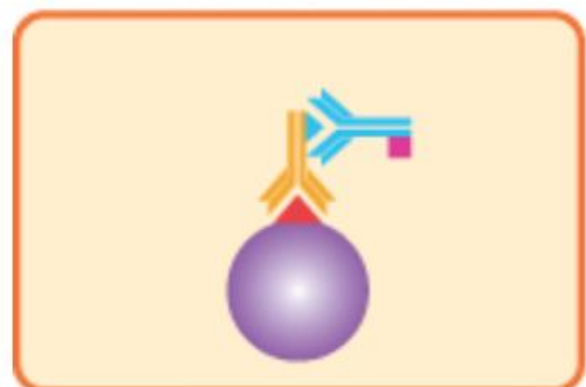
1. 非働化したサンプル血清とC1qを混合



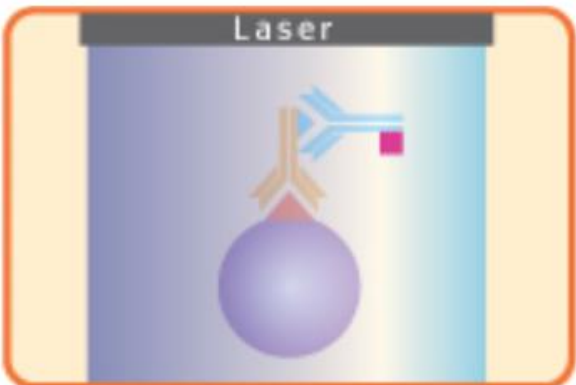
2. LABScreenビーズと1.を混合し、20分反応



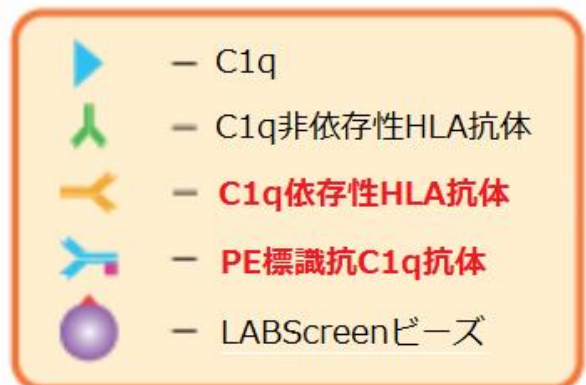
3. 抗C1q二次抗体を加え、室温で20分反応



4. PBSで洗浄 (1回のみ)



5. LABScanシステムで測定



※本図における「HLA抗体」とは「抗HLA抗体」の事を示す

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 1,300g 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	ClqScreen Negative Control Serum	100 uL (20test)	超冷凍 (-65°C)
C1QS-PC1	ClqScreen Class I Positive Control		超冷凍 (-65°C)
C1QS-PC2	ClqScreen 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°C30 分で反応する。

(イ) 8,00-10,000g 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)
 - (イ) 2. (イ) で予め 5 倍希釈した C1q を各ウェルに 5 uL 分注する。(少数検体の場合は、各ウェルに HEPES Buffer を 4 uL、C1q を 1 uL 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 4.5 uL と、Positive Control ビーズ 0.5 uL 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。(洗浄せずに、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、1,300g で 5 分間 又は 1,500g 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わない。)
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。