
QCWS 参考プロトコル

HLA 抗原検査

PCR-SSO (INNO-LiPA)

(Polymerase Chain Reaction - Sequence-specific Oligonucleotide)

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. 検査の準備.....	1
1. 1 検査機器・試薬.....	1
1. 2 試薬.....	1
2. 操作手順.....	2
2. 1 検体準備.....	2
2. 2 検査手順.....	2
3. 注意事項.....	6

1. 検査の準備

1.1 検査機器・試薬

1.1.1 機器・器具の準備

機器	分光光度計(260nmと280nm)
	PCR装置 PE-480 サーマルサイクラーまたは、PE-9700 サーマルサイクラー
	ウォーターバス(振盪できるもの)
	ボルテックスミキサー
	マイクロ遠心機
器具	無菌チューブ (スクレアーゼフリー) 1.5mL チューブ
	ピペット
	ディスクチップ

1.2 試薬

1.2.1 キット名

Kit名	梱包単位	保存温度
INNO-LiPA HLA-A Update	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20℃)
INNO-LiPA HLA-B Update Plus	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20℃)
INNO-LiPA HLA-C	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20℃)
INNO-LiPA HLA-DPB	20 Tests	冷蔵(4℃)
INNO-LiPA HLA-DQA1	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20℃)
INNO-LiPA HLA-DQB1 Update	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20℃)
INNO-LiPA HLA-DRB decoder	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20℃)
INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20℃)

1.2.2 キット内容 INNO-LiPA HLA-A Multiplex について記す。

試薬名	容量	数量	内容
LiPA HLA-Aストリップ1	20枚入	1本	藍色のマーカーラインがストリップ上に印刷
LiPA HLA-Aストリップ2	20枚入	1本	濃緑色のマーカーラインがストリップ上に印刷
LiPA HLA-A Control (LC)	50 µL	1本	EDTAと防腐剤の0.01% (MIT), 0.1% (CAA) を含んだTris buffer 中のコントロールで緑色のキャップ
DS	1 mL	1本	Denaturation Solution
HS	80 mL	2本	Hybridization Solution
SW	200 mL	2本	Stringent Wash Solution
C	1.5 mL	1本	濃縮Conjugate使用前にConjugate Diluent (CD) で100倍に希釈
CD	150 mL	1本	Conjugate Diluent
S	1.5 mL	1本	BCIP/NBT Substrate Solution 使用前にSubstrate Buffer (SB) で100倍に希釈
SB	235 mL	1本	Substrate Buffer
RS	80 mL	2本	濃縮Rinse Solution、使用前に蒸留水で5倍希釈
インキュベートトレイ		5枚	8本の溝付トレイ
プラスチックリーディングチャート		1枚	陽性プローブ確認用
LiPA HLA-Aタイピングテーブル		1枚	結果のマニュアル解釈用
データレポートシート		2枚	発色したストリップの保存用

1.2.3 キット以外に必要な試薬

INNO-LiPA HLA-DPBのみ *Taq* DNA polymeraseが添付されていないため、AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems)を用意する。

2 操作手順

Locus 毎にマニュアルが存在する。ここでは、INNO-LiPA HLA-A Multiplex について記す。

2.1 検体準備

2.1.1

- ① 検体 DNA を 0.02~1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度になるように TE buffer または滅菌蒸留水で希釈する。
- ② DNA の純度は分光光度計で (A260/A280) が 1.7~1.8 である事を確認する。
- ③ バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスする。
 - ・ HLA-A Amplification Buffer 0.3 mL (AB)
dNTPs、0.05%NaN₃が入った黄色キャップのチューブ
 - ・ HLA-A Primer Solution 0.3 mL (HLA-A)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05% NaN₃が入った桃色キャップのチューブ
 - ・ LiPA-*Taq* 35 μL (LT)
Taq DNA polymerase (2U/ μL)、0.05% NaN₃が入った紫色のキャップのチューブ

2.2 検査手順

2.2.1 検体の調製

1. 必要なバイアルの数 (N) を決める。
 - ・ DNAサンプル数 (N) + 1 (陰性コントロール: DNAを添加しない) + 1
 - ・ オートクレーブ滅菌した1.5 mLチューブに、フィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製する。この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 μL)。

23.75 μL	× N	オートクレーブ 済蒸留水	
10 μL	× N	Amplification buffer	(AB: 黄色キャップ)
10 μL	× N	HLA-A Primer Solution	(HLA-A: 桃色キャップ)
1.25 μL	× N	LiPA- <i>Taq</i>	(LT: 紫色キャップ)

2. 優しくボルテックスにかけ、PCRチューブにマスターミックスを45 μL ずつ小分けする。

2.2.2 PCR増幅

1. 調製した DNA 5 μL (0.1~7.5 μg) をピペットで添加する。
(PE-480を使用する場合、各チューブにミネラルオイルを2滴 (≒ 40 μL) ずつ添加する。)
2. 陰性コントロールチューブに蒸留水 (DNA無し) 5 μL を添加する。
3. 合計50 μL のDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーにセットする。

2.2.3 PCR反応条件

1. HLA- Class I amplification, DRB1, DRB1*03, 11, 13, 14の条件 (PE-9700)

	Step	Temp	Time	Cycle
1	Denature	96°C	5 min	
2	Denature	96°C	30 sec.	
3	Anneal primers	64°C	50 sec.	5 cycles
4	Extend primers	72°C	50 sec.	
5	Denature	96°C	30 sec.	
6	Anneal primers	62°C	50 sec.	5 cycles
7	Extend primers	72°C	50 sec.	
8	Denature	96°C	30 sec.	
9	Anneal primers	60°C	50 sec.	10 cycles
10	Extend primers	72°C	50 sec.	
11	Denature	96°C	30 sec.	
12	Anneal primers	55°C	50 sec.	15 cycles
13	Extend primers	72°C	50 sec.	
14	Elongate	72°C	10 min.	

* クラスIの反応条件は全て同一。

2. DRB1, DRB decoder (DRB1+3+4+5, 86G, 86V) DQB1の条件 (PE-9700)

	Step	Temp	Time	Cycle
1	Denature	95°C	5 min	
2	Denature	95°C	20 sec.	
3	Anneal primers	58°Cs	20 sec.	35 cycles
4	Extend primers	72°Cs	20 sec.	
5	Elongate	72°C	10 min	

* DRB1、DRB decoder、DQB1の反応条件は同一。

3. DPB の反応条件 (PE-9700)

	Step	Temp	Time	Cycle
1	Denature	96°C	5 min	
2	Denature	96°C	15 sec.	
3	Anneal primers	55°C	20 sec.	30 cycles
4	Extend primers	72°C	20 sec.	
5	Elongate	72°C	10 min	

4. 増幅後のサンプルは直ちにテストを実施するか、または-15~-20°Cでサンプルを保存。

注意：未反応の増幅用試薬と増幅したPCR産物は、一緒に保存しない。

2.2.4 増幅の確認

1. 増幅産物の存在の有無を、2%アガロースゲル電気泳動により確認する。
増幅産物10 μ Lをゲルにアプライし、下記のサイズに増幅産物のバンドが見られることを確認後次のステップに進む。

◇ A	578bp (exon1-2), 436bp (exon3), 377bp (exon4)
◇ B	555bp (exon2), 436bp (exon3), 323bp (exon4)
◇ C	904bp
◇ DRBおよびDRB1 decoder	280bp
◇ DQB	1261bp (exon2), 250bp (exon3)
◇ DPB	280bp

2.2.5 ハイブリダイゼーション準備

1. 増幅産物は10 μ L使用する。
2. LiPA HLA Control sampleは10 μ L 使用する。
3. ブランクの増幅コントロールサンプル (Negative Control) も10 μ L使用する。
4. 全てのテスト材料は使用前に室温 (20–25°C) に戻す。
5. Hybridization Solution (HS) とStringent Wash Solution (SW) は、37°C以上で予め温めておく。但し56°Cは越えないように注意。(全ての結晶は使用前に溶かしておく)。

6. Rinse Solution

濃縮Rinse Solution (RS) を、蒸留水またはイオン交換水で5倍希釈して使用する。
チャンバー1個あたり8 mLのRinse Solutionと、さらに余分に10 mLを用意する。

7. Conjugate Solution

濃縮Conjugate (C) をConjugate Diluent (CD) で100倍希釈して使用する。
チャンバー1個あたり2 mLのConjugate Solutionと、さらに余分に2 mLを用意する。
(Conjugate Solutionはstringent washの間に調製可能)

8. Substrate Solution

濃縮BCIP/NBT Substrate (S) をSubstrate Buffer (SB) で100倍希釈して使用する。
チャンバー1個あたり2 mLの希釈したSubstrateと、さらに余分に2 mLを用意する。
(Substrate Solutionは conjugate incubation間に調製可能)

2.2.6 変性とハイブリダイゼーション

1. 振盪可能なウォーターバスを 56 \pm 0.5°Cに温めておく。目盛り付き温度計でウォーターバスの温度を確認する。Hybridization Solution (HS) とStringent Wash Solution (SW) はウォーターバス中で 37°C以上 56°Cを越えない温度に予め温めておく。使用前に混合する。全ての結晶は使用前に溶かしておく。

2. ピンセットを用いてチューブからストリップを必要な数だけ取り出す（各テストにより異なるので注意）。LiPA HLA Control サンプル (LC) とブランクコントロールを含めて実施する。2種類のストリップのLCは両方ともハイブリダイゼーション温度が適切かを確認する目的で行うので、どちらか一方のLCを用いれば構わない。
3. 検体番号をストリップのラインマーカー上側に鉛筆で書き込む（ボールペン不可）。常に DNA を添加しないランクコントロール用として1本のストリップを用意する。
4. 必要な数のテストチャンバーを取り出し（テストサンプル毎に1個）、トレーに置く。
5. 各チャンバーの上側角に Denaturation Solution (DS) 10 μ L をピペットで入れる。
注：使用後は直ちにバイアルを閉める。
6. 10 μ L のサンプルを加え、上下にピペッティングし注意深く混合する。常に滅菌ピペットチップを使用する。変性させるため、20-25°Cで5分間放置する。
7. 予め温めておいた Hybridization Solution (HS) を振り混ぜ、2 mL ずつゆっくりと各チャンバーに変性した増幅産物に添加する。 ゆっくりとトレーを前後に揺り動かし混合する。
ピペッティングの間に、隣接するチャンバーと混ざらないように注意。
8. 直ちに印をした面が上になるようにストリップをチャンバーに置く。ストリップは溶液に完全に浸るようにする。
注：使い捨て手袋をはめ、ピンセットを使用する。
9. トレーを 56°C の振盪可能なウォーターバスに置く（約 80rpm）。
10. ふたをして30分間インキュベートする。
注：ウォーターバスから溝に水が飛び散らないようにする。 溝の高さの1/3から1/2になるように水位を調節する。トレーに水が入らないように注意。

2.2.7 洗浄

1. ハイブリダイゼーションの後、トレーをウォーターバスから取り出す。
2. トレーを少し傾けて、ピペットでチャンバーから液体を吸い取る。吸引アスピレーターを用いることが好ましい。 予め温めておいた Stringent Wash Solution (SW) 2 mL を各チャンバーに加え、20-25°Cでトレーを簡単に揺り動かし（10-20 秒間）洗浄する。各チャンバーから溶液を吸い取る。もう一度この洗浄を繰り返す。
3. 最後に溶液を吸い取り、予め温めておいた Stringent Wash Solution (SW) 2 mL を各チャンバーに加え、56 \pm 0.5°Cの振盪可能なウォーターバスで10分間インキュベートする。ウォーターバスのふたは閉めておく。 **インキュベーション前に温度計でウォーターバスの温度を確認し、必要に応じて温度を調節する。 常にふたは閉めておく。**
注：Stringent Wash の間に濃縮 Rinse Solution (RS) や Conjugate (C) を希釈しておく。

2.2.8 発色

一連のインキュベーションは全て、シェーカー上 (20-25°C)で行う。インキュベーションの間、均一な染色を行なうために液体とテストストリップが、チャンバーの中で前後に動くようにする。

1. 各ストリップを希釈した Rinse solution 2 mL で1分間、2回洗浄する。
2. 各チャンバーに希釈した Conjugate 2 mL を加え、シェーカー上でトレーを揺り動かしながら、30分間インキュベーションする。
注: Conjugate インキュベーションの最後の10分間で、BCIP/NBT Substrate Solution (S) を希釈する。
3. 各ストリップを希釈した Rinse solution 2 mL で1分間、2回洗浄し、Substrate Buffer (SB) 2 mL でもう一度洗浄する。
4. 各チャンバーに希釈した Substrate solution 2 mL を加え、シェーカー上でトレーを揺り動かしながら、30分間インキュベーションする。
注: BCIP/NBT Substrate Solution (S) は Dimethylformamide を含んでおり、胎児には有害。
さらに、この溶液は吸入や皮膚の接触、飲み込んだりすると有害で目も刺激される。手袋をつけ、保護用の眼鏡を使用する。
5. 少なくとも3分間はシェーカーの上でトレーを揺り動かしながら、蒸留水 2 mL で2回ストリップを洗浄することにより発色を停止させる。
6. ピンセットで、チャンバーからストリップを取り出し、濾紙上に置く。結果を読みとる前に、ストリップを完全に乾燥させます。発色し乾燥したストリップは暗所で保管する。

2.2.9 結果読み取り

陽性の場合、ストリップ上に紫色のバンドが現われる。

ストリップ上にはマーカーライン、Cojugate コントロールライン (Conj. control)、コントロールラインが現れる。

添付のプラスチックリーディングチャートをストリップ上に重ね、陽性バンドを確認する。

付属のコンピューターかタイピングテーブルを利用して HLA 判定を行う。

3. 注意事項

- 未開封の試薬や、2~8°Cで保存した全ての試薬 (テストストリップを含む) は、使用期限まで安定している。試薬は凍結させない。
- キットはDNAの混入の原因となるようなもの、特にDNA増幅産物からは隔離して保存する。
- 全ての試薬やテストストリップの入ったプラスチックチューブは、使用の約30分前に室温 (20-25°C) に取り出し、使用後は直ちに冷蔵庫に戻す。
- Denaturation Solution (DS) の入ったバイアルは使用後直ちにフタを閉める。
この溶液を空気中に長時間さらすと変性能力が急速に劣化する。
- キット中の試薬類の外観による変化は、不安定性や劣化を示している。

- 発色後の乾燥したストリップは遮光して、室温（20-25℃）で保存する。
- 危険性の考えられる含有物については、製品ラベルおよび製造物安全データを参照する。
- LiPA Control (LC)、Conjugate (C)、Conjugate Diluent (CD)、Rinse Solution (RS) には防腐剤として、MIT/CAAを含んでいる。
- **BCIP/NBT Substrate Solution (S) はDimethylformamideを含んでいて、胎児には有害。さらに、この溶液は吸入や皮膚の接触、飲み込んだりすると有害で、目も刺激される。手袋をつけ、保護用の眼鏡をして取り扱う。**
- Denaturation Solution (DS) は水酸化ナトリウムを含み、目や皮膚を刺激する。手袋をつけ、保護用の眼鏡を使用する。
- ストリップの取り扱いに関して
 - ストリップを素手で触れず、清潔なピンセットを用いて取り扱う。
 - ストリップの番号記入には鉛筆を用い、ボールペン等は使用しない。番号はストリップのマーカーラインの上側に記入する。
 - ストリップはチャンバーの中では、プローブがコートされた面（印がある面）を上側に置く。
 - インキュベーションの間、ストリップは常に同一のチャンバー内で実験を行う。
 - 未使用のストリップおよび発色後のストリップは、強い光や熱から避けて保存する。
 - 発色後のストリップは、判定やカバーをして保存する前に完全に乾燥させておく。
 - 発色後の乾燥ストリップは、20-25℃の暗所で保存する。