

---

QCWS 参考プロトコル

# HLA 抗原検査

---

PCR-SSO (Luminex)

(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 検査機器の準備.....	1
1. 2 検体の準備.....	1
2. 試薬の準備.....	2
2. 1 LABType.....	2
2. 2 WAKFlow.....	2
2. 3 ジェノサーチ.....	3
3. 検査 (PCR) .....	4
3. 1 LABType.....	4
3. 2 WAKFlow.....	5
3. 3 ジェノサーチ.....	6
4. 検査 (ハイブリダイゼーションと SAPE 反応) .....	8
4. 1 LABType.....	8
4. 2 WAKFlow.....	9
4. 3 ジェノサーチ.....	10
5. 測定.....	13
5. 1 LABType.....	13
5. 2 WAKFlow.....	13
5. 3 ジェノサーチ.....	14
6. 解析.....	14
6. 1 LABType.....	14
6. 2 WAKFlow.....	14
6. 3 ジェノサーチ.....	15
7. トラブルシューティング.....	16
7. 1 共通.....	16
7. 2 LABType.....	17
7. 3 WAKFlow.....	19
7. 4 ジェノサーチ.....	19

8. 注意事項.....	20
8. 1 注意事項.....	20
9. メンテナンスおよび点検（参考）.....	20
9. 1 ピペット等.....	20
9. 2 サーマルサイクラー.....	20
9. 3 Luminex.....	21
10. 様式.....	21

## 1. 検査の準備

## 1. 1 検査機器の準備

## 1.1.1 検査器具・資材の準備

機器	サーマルサイクラー Luminex システム パーソナルコンピューター マイクロプレート遠心分離装置 ボルテックスミキサー プレートミキサー* チューブ用遠心機 クリーンベンチ*
器具・資材	マイクロピペット ピペットチップ マイクロチューブ 0.2mLPCR チューブ* 96 ウェル PCR プレートおよび PCR ロープロファイルプレート* PCR プレートシール* マルチチャンネルピペット* 連続分注器* アイスブロック* 使い捨て手袋 (パウダーフリー)

\*必要に応じて準備する。

## 1. 2 検体の準備

## 1.2.1 検体処理

- (1) QCWS 参考プロトコルの **DNA 抽出** に従い DNA 抽出を行う。汚染防止のため、増幅 DNA を扱うエリアとは別のエリアで行う。
- (2) 検体 (DNA) は、試薬メーカー推奨濃度に調製する。
  - ・ LABType (One Lambda) : 20~40ng/ $\mu$ L (20 ng/ $\mu$ L を推奨) A260/280 1.65~1.80
  - ・ WAKFlow (湧永製薬株式会社) : 5~40 ng/ $\mu$ L (20 ng/ $\mu$ L を推奨) A260/280 1.7~

2.0

- ・ジェノサーチ (医学生物学研究所) :10~20 ng/ $\mu$ L A260/280 1.5 以上

## 2. 試薬の準備

### 2. 1 LABType

#### 2.1.1 試薬キット名

(1) LABType SS0(One Lambda)各種

(2) LABType HD(One Lambda)各種

#### 2.1.2 キット構成

試薬	保存方法
①Primer Set D-mix	-80~-20℃保存
②Locus-Specific Primer Set	
③Denaturation Buffer	-80~25℃保存 (再凍結可)
④Neutralization Buffer	
⑤Hybridization Buffer	
⑥Wash Buffer	
⑦SAPE Buffer	-80~8℃ (再凍結不可) 一度解凍したら 2~8℃保存
⑧Bead Mixture	-80~-20℃保存 解凍後 2~8℃で 3 ヶ月保存可

#### 2.1.3 キット外購入品

R-Phycoerythrin-Conjugated Streptavidin-SAPE (OLI Cat. #LT-SAPE)
Recombinant Taq polymerase AmpliTaq Polymerase, OLI catalog IDs TAQ30, TAQ50 and TAQ75)

### 2. 2 WAKFlow

#### 2.2.1 試薬キット名

(1) WAKFlow HLA タイピング試薬キット (湧永製薬株式会社) 各種

## 2.2.2 キット構成

試薬	保存方法
①増幅試薬	-15℃以下に保存
②DNA ポリメラーゼ液	
③変性液	2～8℃に保存 ⑤および⑥は遮光して2～8℃に保存
④ハイブリダイゼーション溶液	
⑤ビーズミックス	
⑥SAPE (蛍光ストレプトアビジン)	
⑦洗浄液	
プレートシール	室温

## 2.3 ジェノサーチ

## 2.3.1 試薬キット名

- (1) ジェノサーチ HLA Ver.2 各種

## 2.3.2 キット構成

試薬	保存方法
①マスターミックス	①および⑥は-15～-35℃に保存。 ②～⑤は2～8℃に保存。 ②および④は遮光。
②ビーズミックス	
③ハイブリダイゼーション緩衝液	
④SA-PE	
⑤リン酸緩衝液	
⑥Taq DNA ポリメラーゼ	

### 3. 検査 (PCR)

#### 3. 1 LABType

##### 3.1.1 準備

- (1) サーマルサイクラーの電源を入れる。
- (2) 使用する器具の清掃をする。使用後も行う。

##### 3.1.2 DNA 分注

- (1) 氷上に PCR チューブまたは 96 ウェル PCR プレート置き、DNA 検体を各  $2.0 \mu\text{L}$  ずつ分注する。
- (2) スピンドアウンし、チューブまたはウェルの底にしっかり分注されている事を確認する。

##### 3.1.3 プレミックス液の調製

- (1) Primer Set D-mix、Locus-Specific Primer Set、Taq DNA ポリメラーゼおよび調製用チューブを氷冷しておく。
- (2) 検体数に合わせ、下記の量で必要量を氷上操作にて調製する。

下記で使用する Ampli Taq は、OLI catalog IDs TAQ30、TAQ50 または TAQ75 を推奨する。Ampli Taq Gold は使用しない。

Taq DNA ポリメラーゼは、少量で不正確になりやすいため、少なくとも 5 検体分程度調製することが望ましい (7. **トラブルシューティング**を参照)。また、Taq DNA ポリメラーゼはボルテックスしない。

1 検体あたりの使用量		操作
Primer Set D-mix	$13.8 \mu\text{L}$	
Locus-Specific Primer Set	$4.0 \mu\text{L}$	添加後しっかりピペッティング
Taq DNA ポリメラーゼ	$0.2 \mu\text{L}$	添加後数回ピペッティング
計	$18.0 \mu\text{L}$	

##### 3.1.4 試薬分注

- (1) DNA 分注済みの PCR チューブまたはプレートに、調製したプレミックス液を各ウェル  $18 \mu\text{L}$  ずつ分注する。
- (2) PCR プレートの場合には PCR 用プレートシールをする。



## 3.1.5 PCR 反応

(1) 以下の条件で設定したサーマルサイクラーで PCR 反応をさせる。

サーマルサイクラーは、PE9600/9700 (アルミヘッド不可) および Veriti を使用する。

GeneAmp PCR system 9700 を使用する場合の「Ramp speed」は、9600Mode にする。

PCR は、ホットスタートを推奨する。

ステップ	温度と時間	サイクル数
ステップ 1	96°C 3 min	1
ステップ 2	96°C 20 sec	5
	60°C 20 sec	
	72°C 20 sec	
ステップ 3	96°C 10 sec	30
	60°C 15 sec	
	72°C 20 sec	
ステップ 4	72°C 10 min	1
ステップ 5	4°C forever	1

(2) PCR 終了後、すぐにハイブリダイゼーション以降の操作を行わない場合は 4°C に保管する。

## 3.2 WAKFlow

## 3.2.1 準備

(1) サーマルサイクラーの電源を入れる。

(2) 使用する器具の清掃をする。使用後も行う。

## 3.2.2 反応溶液の調製・分注

(1) 検体数に合わせ、下記の量で必要量を調製する。調製は氷冷で行う。

1 検体あたりの使用量		操作
増幅試薬	24.5 $\mu$ L	
DNA ポリメラーゼ	0.5 $\mu$ L	添加後ボルテックスする
計	25.0 $\mu$ L	

- (2) 氷上に PCR チューブまたはプレート置き、混合した反応溶液を各 25.0  $\mu$ L ずつ分注する。

### 3.2.3 DNA 検体の分注

- (1) 反応液分注済みの PCR チューブまたはプレートに、DNA 検体を各ウェル 2  $\mu$ L ずつ分注する。
- (2) PCR プレートの場合には PCR 用プレートシールをする。
- (3) ボルテックスで混和する。ただし、検体数が少ない場合は、DNA 検体分注時にピペッティングしてもよい。

### 3.2.4 PCR 反応

- (1) 以下の条件で設定したサーマルサイクラーで PCR 反応をさせる。

\*Gold-96well GeneAmp PCRSystem 9700 を用いた場合。

「Reaction volume」 27  $\mu$ L 「Ramp speed」 Max

ステップ	温度と時間	サイクル数
ステップ 1	93°C 3 min	1
ステップ 2	93°C 30 sec	40
	60°C 30 sec	
	72°C 30 sec	
ステップ 3	4°C forever	1

- (2) PCR 終了後、すぐにハイブリダイゼーション以降の操作を行わない場合は 4°C に保管する。

## 3.3 ジェノサーチ

### 3.3.1 準備

- (1) サーマルサイクラーの電源を入れる。
- (2) 使用する器具の清掃をする。使用後も行う。

## 3.3.2 反応溶液の調製・分注

- (1) 検体数に合わせ、下記の量で必要量を調製する。調製は氷冷で行う。

1 検体あたりの使用量		操作
マスターミックス	20.0 $\mu$ L	
Taq DNA ポリメラーゼ	0.625 $\mu$ L	添加後ボルテックスする
計	20.625 $\mu$ L	

- (2) 氷上に PCR チューブまたはプレートを置き、混合した反応溶液を各 20.0  $\mu$ L ずつ分注する。1 ウェルは、ネガティブコントロールとして使用する。

## 3.3.3 DNA 検体の分注

- (1) 氷冷した反応液分注済みの PCR チューブまたはプレートに、DNA 検体を各ウェル 5  $\mu$ L ずつ分注する。
- (2) PCR プレートの場合には PCR 用プレートシールまたはドームキャップで蓋をする。
- (3) ボルテックスで混和した後、スピンドウンする。ただし、検体数が少ない場合は、DNA 検体分注時にピペッティングしてもよい。

## 3.3.4 PCR 反応

- (1) 以下の条件で設定したサーマルサイクラーで PCR 反応をさせる。

\*Gold-96well GeneAmp PCRSystem 9700 を用いた場合。

「Reaction volume」 25  $\mu$ L 「Ramp speed」 Max

ステップ	温度と時間	サイクル数
ステップ 1	94°C 2 min	1
ステップ 2	94°C 30 sec	40
	65°C 30 sec	
	72°C 30 sec	

- (2) PCR 終了後、すぐにハイブリダイゼーション以降の操作を行わない場合は 4°C に保管する。

## 4. 検査 (ハイブリダイゼーションと SAPE 反応)

## 4. 1 LABType

## 4. 1. 1 準備

- (1) サーマルサイクラーの電源を入れ、60°Cに設定しておく。
- (2) Luminex の電源を入れ、準備をする。
- (3) 使用する器具の清掃をする。使用後も行う。

## 4. 1. 2 ハイブリダイゼーション

- (1) 反应用 PCR チューブまたはプレートに Denaturation Solution 各 2.5  $\mu$ L を分注する。
- (2) (1)に DNA 増幅サンプル各 5.0  $\mu$ L 加え、よくピペッティングし、溶液が濃いピンク色になるのを確認後、室温で 10 分間インキュベーションする。
- (3) Neutralization Buffer を各 5.0  $\mu$ L を加え、よくピペッティングし溶液が透明に変化するのを確認する。透明にならない場合は、透明になるまで 1  $\mu$ L ずつ Neutralization Buffer を追加する。
- (4) 氷冷でハイブリビーズミックスを下記の量で調製をする。調製後は氷冷・遮光保存する。ビーズはよく混和して使用する。

1 検体あたりの使用量		操作
Beads Mixture	4.0 $\mu$ L	
Hybridization Buffer	34.0 $\mu$ L	添加後ボルテックス
計	38.0 $\mu$ L	

- (5) (3)にハイブリビーズミックス各 38  $\mu$ L を加える。プレートの場合はしっかりシールを貼り、60°C15 分間反応後、氷冷する。

## 4. 1. 3 洗浄操作

- (1) 冷蔵または氷冷した Wash Buffer を 100  $\mu$ L 加え、遠心 (1500g 3 分間または 1300g 5 分間) する。
- (2) 垂直にフリッキングして溶液を除去後、キムワイプ等の上で 5 回程度タッピングし、ドライボルテックスする。

- (3) (1)～(2)の洗浄操作を2回繰り返す。

#### 4.1.4 SAPE 反応

- (1) SAPE 溶液を下記の量で調製する。調製後は遮光保存する。

1 検体あたりの使用量		操作
SAPE Buffer	49.5 $\mu$ L	
SAPE	0.5 $\mu$ L	添加後ボルテックス
計	50.0 $\mu$ L	

- (2) SAPE 溶液各 50  $\mu$ L を加え、ボルテックスし 60°C で正確に 5 分間インキュベーションする。
- (3) 4.1.3(1)～(2)の洗浄操作を1回行い、Wash buffer を 70  $\mu$ L 加え LABScan/Luminex で測定する。

## 4.2 WAKFlow

### 4.2.1 準備

- (1) サーマルサイクラーの電源を入れ、55°C に設定しておく。
- (2) Luminex の電源を入れ、Luminex XYP を 37°C に設定しておく。
- (3) 使用する器具の清掃をする。使用後も行う。
- (4) 変性液、ハイブリダイゼーション溶液、洗浄液を取り出し、室温に戻しておく。

### 4.2.2 ハイブリダイゼーションと SAPE 反応

- (1) 変性液 5  $\mu$ L を反応チューブまたはプレートに分注する。
- (2) PCR 終了後の増幅 DNA 5  $\mu$ L を加え、ピペティング (4 回) またはボルテックスでよく混合し、室温で 5～10 分静置する。

- (3) 検体数に合わせ、下記の量で必要量を調製する。

1 検体あたりの使用量		操作
ハイブリダイゼーション溶液	20.0 $\mu$ L	
ビーズミックス (各 Locus 専用)	3.0 $\mu$ L	
SAPE	2.0 $\mu$ L	添加後ボルテックス
計	25.0 $\mu$ L	

- (4) (2)で変性した増幅 DNA に(3)で調製したハイブリミックス 25  $\mu$ L を手早く加え、蓋または PCR シールをし、ボルテックスでよく攪拌する。蓋やシールに反応液が付着した場合はスナッピングまたはスピンドウンによって反応容器内に落とす。

ハイブリミックスを加えてサーマルサイクラーにセットするまでに時間がかかる場合は、氷上で操作する。

- (5) 55°Cに設定したサーマルサイクラーに直ちにセットし、30 分間のハイブリダイゼーションを行う。

#### 4.2.3 洗浄操作

- (1) 洗浄液 75  $\mu$ L を各ウェルに加え、3000rpm (約 1000 $\times$ g) 1 分間遠心する。
- (2) 上清をスナッピング後、そのままキムワイプ等の上で余剰液を除く。アスピレータによる除去でもよい。

溶液が多く残った場合は、再度洗浄操作をする。

- (3) 洗浄液 75  $\mu$ L をウェルに加え、XYP のブロック温度が 37°Cであることを確認して、Luminex で測定する。

測定前に室温放置すると非特異反応の原因となるため、速やかに XYP 上にセットする。また、37°Cの XYP 上に 5~10 分程度静置することで、非特異反応が抑えられる場合もある。

### 4.3 ジェノサーチ

#### 4.3.1 準備

- (1) サーマルサイクラーの電源を入れる。
- (2) Luminex の電源を入れ、Luminex の XYP のブロック温度を 37°Cに設定する。

(3) 使用する器具の清掃をする。使用後にも行う。

#### 4.3.2 ハイブリダイゼーション

(1) 検体数に合わせ、下記の量で必要量を調製する。

1 検体あたりの使用量		操作
ハイブリダイゼーション緩衝液	20.0 $\mu$ L	
ビーズミックス	5.0 $\mu$ L	使用前にボルテックス。 ハイブリダイゼーション緩衝液に添加後、ボルテックス。
計	25.0 $\mu$ L	

(2) PCR ロープファイルプレートに調製したハイブリダイゼーション溶液を各ウェルに 25  $\mu$ L ずつ分注する。

(3) PCR 増幅産物を各々 5  $\mu$ L 加え、プレートシール等で蓋をし、ボルテックスで十分混和する。または、ピペッティングで十分混和しプレートシールをする。

(4) サーマルサイクラーにセットし、以下の条件で反応させる。

「Ramp speed」 Max

ステップ	温度と時間	サイクル数
ステップ 1	95°C 2 min	1
ステップ 2	52°C 25min	1
ステップ 3	52°C forever*	*30 min 以内

サーマルサイクラーから取り出した後は速やかに次の操作へ進む。

## 4.3.3 SAPE 反応と洗浄操作

- (1) 検体数に合わせ、下記の量で必要量を調製する。ハイブリダイゼーション中に準備する。

1 検体あたりの使用量		操作
リン酸緩衝液	150.0 $\mu$ L	
SA-PE	1.5 $\mu$ L	添加後ボルテックス 遮光
計	151.5 $\mu$ L	

- (2) 各ウェルに SAPE 反応液 50  $\mu$ L を加える。  
ハイブリダイゼーション反応後、室温放置せず速やかに添加する。
- (3) 1,000 $\times$ g 5min、もしくは 2,000 $\times$ g 1min 遠心後、スナッピングで上清を除去し、そのままキムタオル上で余剰液を除く。
- (4) 再度 (2) ~ (3) を繰り返す。
- (5) SAPE 反応液 50  $\mu$ L を各ウェルに加え、ピペッティングなどで混和し、プレートシール等で蓋をする。
- (6) サーマルサイクラーにセットし、以下の条件で反応させる。

「Reaction volume」 50  $\mu$ L 「Ramp speed」 Max

ステップ	温度と時間	サイクル数
ステップ 1	52°C 10 min	1
ステップ 2	37°C forever*	*30 min 以内

- (7) 速やかに Luminex で測定する。  
短時間の延長は 37°C に置く。



## 5. 測定

### 5. 1 LABType

#### 5.1.1 テンプレートの準備

(1) 以下よりテンプレートを入手する。

Luminex I.S 2.3 の場合

[http://download.onelambda.com/priv/New\\_Pub/Windows/Luminex\\_Templates\\_LX100\\_200/IS2\\_3/LABType/](http://download.onelambda.com/priv/New_Pub/Windows/Luminex_Templates_LX100_200/IS2_3/LABType/)

Luminex 1.7 の場合

[http://download.onelambda.com/priv/New\\_Pub/Windows/Luminex\\_Templates\\_LX100\\_200/v1\\_7/LABType/](http://download.onelambda.com/priv/New_Pub/Windows/Luminex_Templates_LX100_200/v1_7/LABType/)

Luminex Xporment3.1 の場合

[http://download.onelambda.com/priv/New\\_Pub/Windows/Luminex\\_Templates\\_LX100\\_200/Xporment%203\\_1/LABType/](http://download.onelambda.com/priv/New_Pub/Windows/Luminex_Templates_LX100_200/Xporment%203_1/LABType/)

#### 5.1.2 テンプレートのインポート

Luminex100 IS2.3 Software の場合を示す。

- (1) 任意のフォルダーを作成し、テンプレートファイルを保存する。
- (2) Luminex100 IS2.3 Software を開き、ツールバーの File-Import-Template から (1) で保存したテンプレートファイルを選択するとインポートされる。

#### 5.1.3 測定

- (1) 測定には検査に使用した試薬ロットに対応するテンプレートを使用する。

### 5. 2 WAKFlow

#### 5.2.1 テンプレートの準備

- (1) 試薬を購入するとメーカーより送信または送付される。

#### 5.2.2 テンプレートのインポート

- (1) **5.1.2 テンプレートのインポート**に従う。

#### 5.2.3 測定

- (1) 測定には検査に使用した試薬ロットに対応するテンプレートを使用する。

## 5. 3 ジェノサーチ

### 5.3.1 テンプレートの準備

- (1) 試薬を購入するとメーカーより送付される。

### 5.3.2 テンプレートのインポート

- (1) **5.1.2 テンプレートのインポート**に従う。

## 6. 解析

### 6. 1 LABType

#### 6.1.1 解析準備

- (1) 解析ソフト「HLA Fusion」を用いる。
- (2) 以下より入手したカタログファイルをインポートする。  
カタログファイルは試薬の LOT と同じ LOT のものを使用する。  
[http://download.onelambda.com/pub/tray\\_info/Windows/HLA\\_Fusion\\_Catalogs/LABType/](http://download.onelambda.com/pub/tray_info/Windows/HLA_Fusion_Catalogs/LABType/)
- (3) 必要に応じてアシルフィルターや NMDP コードをダウンロードし使用する。
- (4) インポート方法等は、株式会社ベリタス作成「ワンラムダ HLA Fusion インストールマニュアル」に従う。

#### 6.1.2 解析

- (1) 株式会社ベリタス作成「ワンラムダ HLA Fusion 解析マニュアル」に従い解析する。
- (2) コントロールビーズおよび各ビーズの反応性を確認し、明確な判定が出来ない場合は再検査対象あるいは他法による確認検査対象とする。

### 6. 2 WAKFlow

#### 6.2.1 解析準備

- (1) 解析ソフト「WAKFlow Typing Software」を用いる。

- 
- (2) メーカーより送付されたパターンファイルをインポートする。

パターンファイルは試薬の LOT と同じ LOT のものを使用する。

#### 6.2.2 解析

- (1) 湧永製薬株式会社作成の「WAKFlow Typing Software 使用説明書」に従い、解析する。
- (2) コントロールビーズおよび各ビーズの反応性を確認し、明確な判定が出来ない場合は再検査対象あるいは他法による確認検査対象とする。

### 6. 3 ジェノサーチ

#### 6.3.1 解析準備

- (1) 解析ソフト「UniMAG」を用いる。
- (2) メーカーより送付されたパターンファイルをインポートする。

パターンファイルは試薬の LOT と同じ LOT のものを使用する。

#### 6.3.2 解析

- (1) 株式会社医学生物学研究所作成「UniMAG ユーザーチュートリアル」に従い、解析する。
- (2) コントロールビーズおよび各ビーズの反応性を確認し、明確な判定が出来ない場合は再検査対象あるいは他法による確認検査対象とする。

## 7. トラブルシューティング

## 7. 1 共通

トラブル	原因	解決方法
測定時にビーズ カウントが上が らない	洗浄中のロス	フリッキング (スナッピング) は、 <u>真下にすばやく1回</u> 行い、プレートを <u>逆さまにしたまま</u> キムタオルで軽くタッピングする。
	分注したビーズが少なかった。	<u>ボルテックス</u> または <u>ピペッティング</u> で十分に混和してから、ビーズを分注する。
	Luminex 測定まで時間がかかり、ビーズが沈んでいた。	すぐに測定できない場合は、Luminex 測定直前に、軽くボルテックスまたはピペッティングを行って、沈んだビーズを <u>再浮遊</u> させる。
	測定プローブのつまり	プローブを、水または0.5%次亜塩素酸ナトリウムにつけ、 <u>超音波洗浄</u> を行う。また、プローブのつまりを防止する為に、Luminex をシャットダウンする際は必ず0.5%次亜塩素酸で sanitize を行う。
DNA が増幅されて いない。 全体的に反応が 弱い。	試薬の使用期限が切れている	使用期限を厳守する。
	DNA 検体不良	アガロースゲル電気泳動等で増幅 DNA を確認する。 検体 DNA は、推奨濃度・純度に調製する。 検体 DNA 調製を適切な手法でやり直す。
	試薬の混合量が異なる。	少量検体を検査する場合、誤差が大きくなってしまうため、検体数+ $\alpha$ で試薬調製する。
	サーマルサイクラーが故障している。	サーマルサイクラーの状態を確認する。
	サーマルサイクラーの電源を、他の大型機器とシェアしている。	単独の電源を使用する。
	Luminex の不良	キャリブレーションやコントロールビーズで測定状態の確認をする。
ポジティブコントロールは増幅しているが、全ての検体で解析不能となった。	ロットの合わないプライマーを使用した。	プライマーとビーズは必ず、同じロット (LABType は同一箱内) のものを使用する。
	プライマーのコンタミネーション	コンタミネーションが疑われるプライマ

QCWS 参考プロトコル HLA 抗原検査 SSO (Luminex)

	ヨーン	ーは使用しない。
偽陽性反応が強い。	ロットの合わないプライマーを使用した。	プライマーとビーズは必ず、同じロット (LABType は同一箱内) のものを使用する。
	ハイブリダイゼーション反応の時間が長い。	ハイブリダイゼーション温度・時間を守る。
特定のプローブでバックグラウンドが高い	分注時の飛散や不十分なシーリング	十分に注意し、再検査を実施する。
	検体へのコンタミネーション	バックグラウンドが高くなっているプローブから特定のアレルの存在が示されていないか確認する。  検体へのコンタミネーションが疑われる場合には検体 DNA の再調製をし、再検査を実施する。
	キメラ等	プローブから特定のアレルの存在が示されていないか確認する。
特定のプローブで、バックグラウンドが高い、あるいは反応が極端に弱い	新規アレル	他の方法で確認する。
一方のアレルのみ反応が弱い	LOH 等	プローブから特定のアレルの存在が示されていないか確認する。
他社キットとの結果が異なる。	試薬により解像度が異なる。	試薬の特性を確認し、判定する。  区別可能な試薬で確認する。
他方法および再検査等で明らかに判定結果が異なる	検体の取り違い	明らかに判定結果が違う場合は、検体確認を行い、再抽出・再検査等を実施する。

7. 2 LABType

トラブル	原因	解決方法
HLA Fusion 2.0 を使用して LABType の解析をしたが、日本人の頻度と思われるが、G1 の中に表示されな	HLA Fusion 2.0 の血清型ファイル: Sero equivalent とアレルフィルターバージョンがあっていない。	血清型ファイル Sero equivalent のバージョンを確認する方法は、  1. Utilities - Update Reference - Update Reference File を選択。  2. 画面下の、Last Update Date を確認。

<p>い。</p>		<p>現在使用しているアリルフィルターのバージョンを確認する方法は、</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Utilities - Molecular Products configuration - Molecular Analysis Configuration を選択。</li> <li>2. Product Type の LABType を選択。</li> <li>3. Demographic の表示欄から、最新のアリルフィルターを選択して、Save する。</li> </ol>
<p>Exon2、Exon3 のポジティブコントロールは、増幅しているが、全ての検体で解析不能となった。</p>	<p>ロットの合わないプライマーを使用した。</p>	<p>LABType HD では、プライマーとビーズは必ず、同じ箱内のものを使用する。</p> <p>LABType HD と LABType SSO のプライマーは異なるため、混同して使用しない。プライマーとビーズロットの組み合わせを下記から確認する。</p> <p><a href="http://www.onelambda.com/product-attachment.aspx?c1=molecular&amp;c2=labtype-sup-sup-&amp;c3=labtype-sup-sup- sso&amp;c4=2&amp;c5=16&amp;c6=54">http://www.onelambda.com/product-attachment.aspx?c1=molecular&amp;c2=labtype-sup-sup-&amp;c3=labtype-sup-sup- sso&amp;c4=2&amp;c5=16&amp;c6=54</a></p>
<p>偽陽性反応が強い。</p>	<p>洗浄操作が悪い。</p>	<p>ハイブリ前にビーズを加える際には、必ず氷上で分注する。</p> <p>ハイブリダイゼーション (60°C、15 分) 後と、二次抗体結合 (60°C、5 分間) 後、プレートを冷やししながら洗浄バッファーを加える。</p>
<p>LABType のポジティブコントロールビーズの反応が弱く、タイピングができない。</p>	<p>DNA の純度が悪い、濃度が濃すぎる、または薄すぎる。</p>	<p>DNA の純度および濃度を推奨の範囲に調製し使用する。</p> <p>DNA 溶液中の EDTA 濃度は、0.5 mM 以下にする。</p>
	<p>試薬の混合量が異なる。</p>	<p>少量検体 (5 検体以下) を検査する場合、Taq の量が 1ul 以下となり、誤差が大きくなってしまうため、例えば、A、B、C、DR を 2 検体ずつ行う場合は、共通試薬である D-mix と Taq を全ローカスでまとめて調製し、その後各ローカス用に分注し、</p>

QCWS 参考プロトコル HLA 抗原検査 SSO (Luminex)

		各プライマーを混ぜて調製する。
	ABI の Ampli Taq 以外の Taq Polymerase を使用している。	指定の Ampli Taq を使用する。 Ampli Taq Gold は使用不可。
	サーマルサイクラー (PE9600/9700、Veriti) 以外を使用している。	指定のサーマルサイクラーを使用する。 ただし、9700 のアルミヘッドは使用不可。
偽陽性、偽陰性反応の判断がわからない。		全ビーズの反応パターンを確認する。 メーカーの QC 情報を参考にする。 株式会社ベリタスの提供している偽陽性、偽陰性となりやすいビーズと HLA アリルの情報等を参考にする。

7. 3 WAKFlow

トラブル	原因	解決方法
偽陽性反応が強い。	洗浄操作が悪い。	しっかりスナッピングを行う。溶液が多く残った場合には再度洗浄する。
	ハイブリダイゼーション開始までに時間がかかった。	変性した PCR 産物とハイブリミックスを混合した後は速やかにハイブリダイゼーションを開始する。分注に時間がかかる場合には、氷冷し分注する。
	ハイブリダイゼーションの温度がずれている。	ハイブリダイゼーション時の温度が 55°C になっていることを確認する。
特定のプローブでバックグラウンドが高い	測定値として Median 以外の値を使った。	判定には Median を使う。

7. 4 ジェノサーチ

トラブル	原因	解決方法
偽陽性反応が強い。	ハイブリダイゼーション後に長時間放置した。	ハイブリダイゼーション反応終了後は速やかに次の操作を行う。
	SA-PE 反応後に長時間放置した。	SA-PE 反応終了後は速やかに次の操作を行う。
反応が弱い	サーマルサイクラーの個体差	サーマルサイクラーのメンテナンスを行う。PCR 条件の変更が必要となる場合が

		あるが、 <u>必ずメーカーへ相談すること。</u>
	SA-PE 反応液添加後の上清除去が不十分。	SA-PE 反応液を添加し遠心した後の上清を、しっかり除去する。
	SA-PE 反応液の混和が不十分。	ビーズと SA-PE 反応液をよく混和する。

## 8. 注意事項

### 8. 1 注意事項

- (1) DNA を扱うエリアは増幅前後で区別する。
- (2) ピペット等の器具は、エリアで区別し共用しない。
- (3) 実験台および使用器具は、用時調製した 0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液でよく拭き取る。
- (4) 試薬は、必ず使用期限内のものを用いる。
- (5) 試薬キットは、PCR から最後の反応まで同一ロットで使用する。
- (6) 使用試薬のロット管理をする。

## 9. メンテナンスおよび点検（参考）

### 9. 1 ピペット等

- (1) コンタミネーション防止の為、0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で清掃や紫外線照射を行う。

### 9. 2 サーマルサイクラー

ライフテクノロジーズジャパン社製の Gold 96-well GeneAmp PCR の場合を示す。それ以外の場合は準じて行う。

#### 9.2.1 定期点検（月 1 回以上）

- (1) Rate test : F4[Util]-F1[Diag]-F2[System]-F1[Rate]-F1[Cont]でモニタに“Pass”が表示されることを確認する。
- (2) Cycle test : F4[Util]-F1[Diag]-F2[System]-F2[Cycle]-F1[Cont]でモニタに“Pass”が表示されることを確認する。



9. 3 Luminex
--------------

Luminex100/200、IS2.3 Software の場合を示す。それ以外の場合は、これに準じて行う。

#### 9.3.1 日常点検（使用時）

- (1) 使用前：コントロールビーズを測定し、System Control Trend Report の Pass/Fail 項目が“Pass”であることを確認する。
- (2) 使用后：プローブのつまりを防止するために、Luminex をシャットダウンする際は必ず 0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で sanitize を行う。

#### 9.3.2 定期点検（月1回以上）

- (1) プローブのつまり除去あるいは防止のために、プローブの超音波洗浄を実施する。
- (2) キャリブレーション：キャリブレーションビーズによるキャリブレーションを実施後、コントロールビーズを測定し、Calibration Trend Report の Pass 項目および System Control Trend Report の Pass/Fail 項目が“Pass”であることを確認する。

### 10. 様式

様式は各施設で書式を規定し、運用すること。