
QCWS 参考プロトコル

HLA 抗原検査

PCR-SBT

(Polymerase Chain Reaction - Sequencing Based Typing)

平成 31 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 | | 記載整備 | 様式に関わる箇所を削除した。 | DNA タイピング WG |

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..... | 12 |

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 xg (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 xg (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 xg (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 xg (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 xg (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 5×10^6 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 : 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) など • サーマルサイクラー : GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) 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 (GENDX) <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <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) | 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 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Hi-Di™ Formamide (4311320/Applied Biosystems) <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 <p><u>MultiScreen システムで精製を行う場合</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Sephadex g-50 Superfine(17-0041-01/GE Healthcare)• MultiScreen HV plates (MAHVN4550/Millipore)• MultiScreen column loader 45 μL (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ばいずれも可 : 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 xg、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 xg、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、Sephadexg-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 Sephadexg-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 シークエンサー対応の 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、シーケ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) スピンドアウンする。
- (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 (GENDX) 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 | <u>_A2F</u> | <u>_B2F</u> | <u>_C2F</u> | <u>_DRBF</u> |
| Exon 2 Reverse | <u>_A2R</u> | <u>_B2R</u> | <u>_C2R</u> | <u>_DRBR</u> |
| Codon | | | | <u>_DRB_GTG</u> |

2.6.3 電気泳動

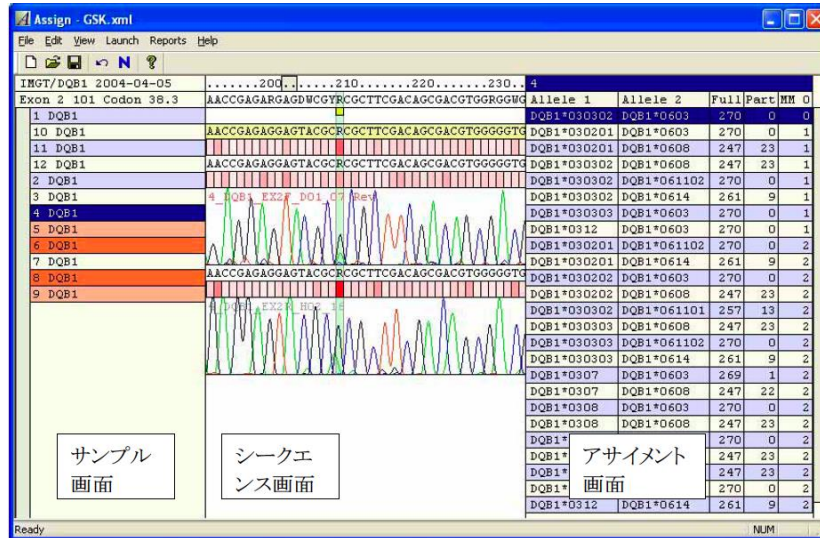
Mobility File や Run Modules は、以下を参考に設定する。

| 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 |

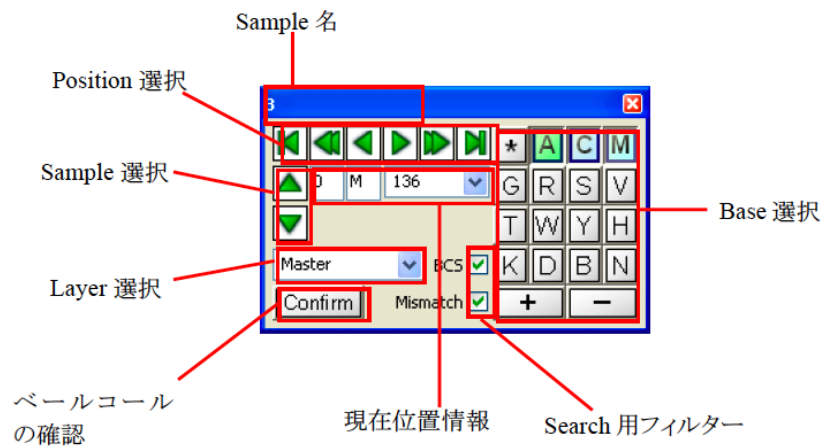
2.7 解析

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

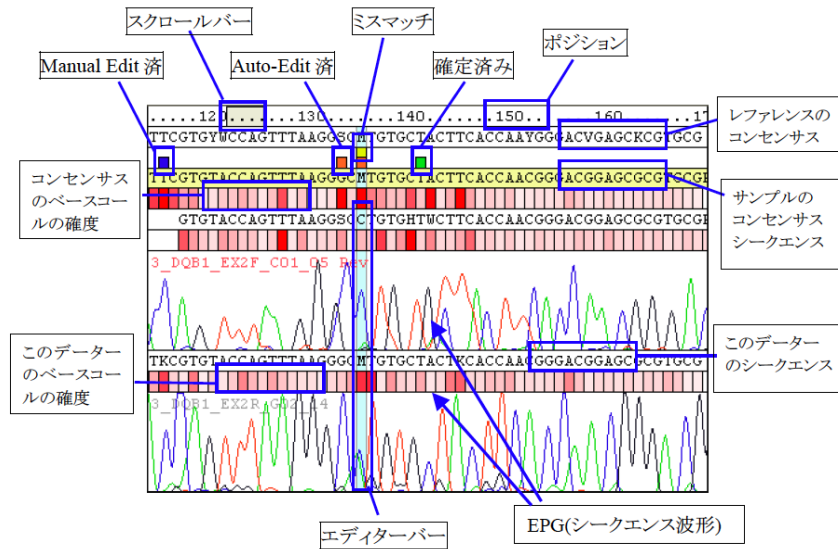
- (1) **File** で **Import** を選択する。ファイルを選択してインポートする場合は、「**selected file**」、フォルダごとインポートする場合は、「**Directory**」を選択する。
- (2) 左側のサンプル画面で、各検体名を順にクリックし、右側のアサイメント画面でタイピング結果を確認する。



- (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。

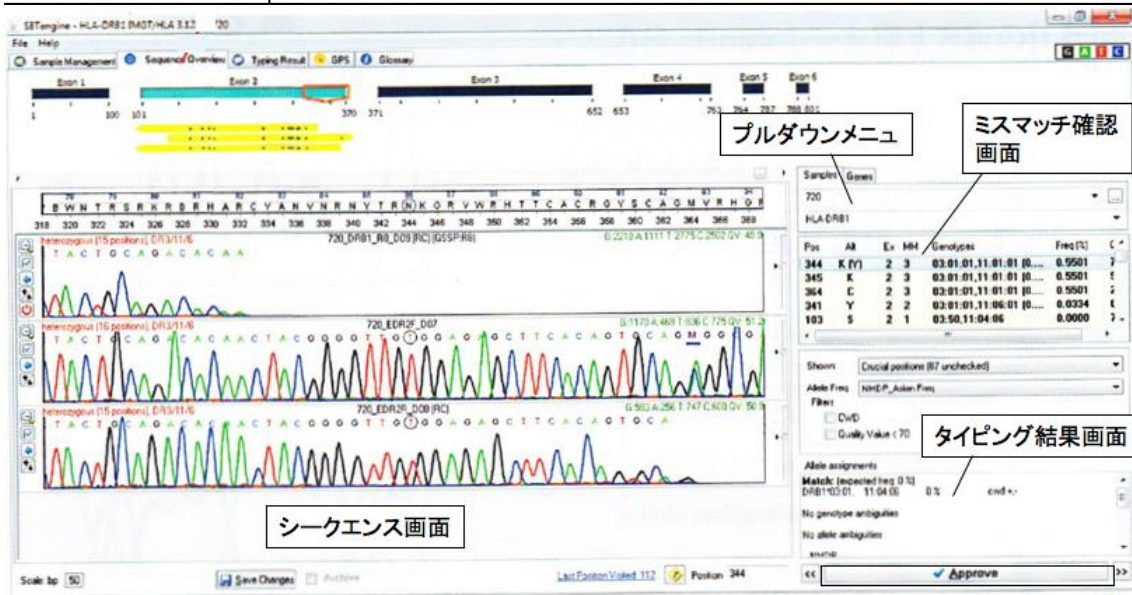
(6) File で Save as を選択し、project に名前をつけ、保存する。

2.7.2 SBTengine (GENDX)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。



- (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。