
QCWS 参考プロトコル

HLA 抗原検査

PCR-SSP

(Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primer)

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. トラブルシューティング.....	6
4. 注意事項.....	8

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: GeneAmp PCR System 9600、9700 または Veriti (Applied Biosystems 社)
	1.5mL マイクロチューブ用遠心機
	1.5mL マイクロチューブ用ミキサー(ボルテックスミキサー)
	電子レンジ
	電気泳動装置(マイクロ SSP ゲルシステム)
	パワーサプライ: 定電圧150V
	UVトランスイルミネーター(312nm)
	ゲル写真撮影装置
	One Lambda 社 HLASSP 判定用ソフトウェアまたは、マイクロ SSPTM ワークシート
器具	可変式ピペットマンとピペットチップ (PCR 前と PCR 後専用 に必ず分ける。)
	8 連マルチチャンネルピペットマン
	シール及びパッド (#SSPPAD)
	PCRトレー用のチューブラック
	アイスバケット

1.2 試薬

1.2.1 キット名

マイクロ SSP HLA DNA タイピング 各種キット

1.2.2 キット以外に必要な試薬

Ampli Taq DNA Polymerase, 5 units/ μ L (Applied Biosystems社: #N-808-0160)
核酸電気泳動用アガロース (例・FMC Seakem LE)
1×TBEバッファー: 89 mM Tris-borate、2 mM EDTA-2Na (pH8.0)、0.5 μ g/mLのエチジウムブロマイドを含む。

2 操作手順

2.1 検体準備

2.1.1

- ①検体 DNA は、滅菌蒸留水または 10 mM Tris-HCl バッファー (pH8.0~9.0) を使用し、濃度を 100 ng/μL (25~200 ng/μL) に調整する。
- ②260nm と 280nm での吸光度比 (OD260/OD280) が 1.7~1.80 である事を確認する。

注意：検体 DNA の調整には 0.5 mM 以上の EDTA、あるいは他のキレート剤を含んだバッファーの使用は避ける。

2.2 検査手順

2.2.1 検体の調製

1. タイピングトレーを冷凍庫から取り出し、室温に戻す。
2. D-Mixの解凍、検体DNAをボルテックスで混和する。
3. “D-Mix-1” 溶液の調製
Ampli Taq DNA polymeraseを冷凍庫から取り出し、氷上に置く。
D-Mix溶液にAmpli Taq DNA polymeraseを加える。(以下 “D-Mix-1” とする。)
※ Ampli Taq DNA polymeraseの量は各Kit添付文書を参照
4. 5秒間ボルテックスで混和後、10,000rpmで数秒遠心する。
5. タイピングトレーのシールを外す。
6. ネガティブコントロールウェル
DNAの溶解に用いた滅菌精製水1 μLと
“D-Mix-1” 9 μL を陰性コントロールウェルに入
れる (赤いマーカーで表示されている箇所)

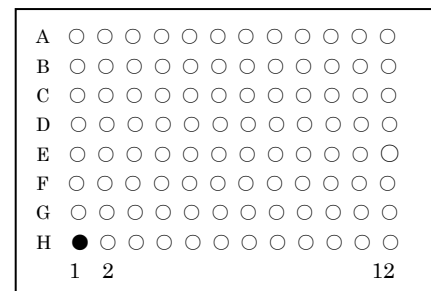
左図は例としてマイクロSSP AB/DR (#SSPABDR) の陰性コントロールのウェル位置を示している。

陰性コントロールはPCRで増幅されたDNAの汚染検出が目的です。通常の検体の調製に使用する水を用いる。他のウェルに入れないように注意。

※ SSPJPNには、陰性コントロールウェルはないので、この操作は不要。

7. “D-Mix-2” 溶液の調製
“D-Mix-1” に検体DNAを加える。
(以下 “D-Mix-2” と記す)

DNAの添加量は、各製品に添付の”Reference Table”を参照。

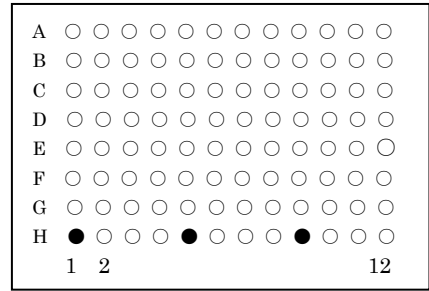


例: マイクロ SSP AB/DR (#SSPABDR)
(1H に陰性コントロール)

8. 5秒間ボルテックスで混和後、10,000 rpmで数秒遠心

9. 10 μ L の“D-Mix-2”を、陰性コントロールを除くウェルに添加

※ SSPJPNには陰性コントロールウェルが無い
ため、“D-Mix-2”をすべてのウェルに添加



例: マイクロ SSP Class II Geniric Typing Kit (DR/DQ) (#SSP2L)
(1H, 5H, 9H に陰性コントロール)

10. タイピングトレーにシールを貼ります
必要に応じて、シールを適切な大きさに切って貼る。

2.2.2 PCR増幅

PCR装置にタイピングトレーをセットする。

- 反応溶液量を10 μ Lにセット
- 増幅時間：約1時間20分
マイクロSSP用パットをトレーの上ののせてPCR装置の蓋を閉める。

※ PCR反応後電気泳動をすぐ行わない場合は、-20℃で保存する。

PCR条件

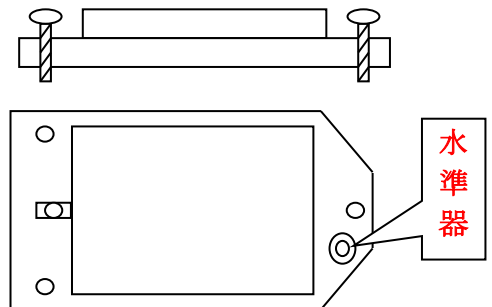
(Applied Biosystems社のGeneAmp System 9600又9700 Veritiを用いた場合)

ステップ数	温度 (°C)	時間 (秒)	サイクル数
1	96	130	1 cycle
2	63	60	
1	96	10	9 cycles
2	63	60	
1	96	10	20 cycles
2	59	50	
3	72	30	
1	4	Forever	END

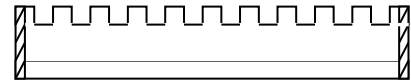
※ GeneAmp PCR System 9700およびVeritiでは、Ramp Speedを“9600”に設定する。

2.2.2 アガロースゲル (Micro SSP Gel System) の作製

1. ゲルボックスをベースにはめ込み、(赤: +極、黒: -極)、ロッキングピンを締めゲルボックスを固定する。
2. 付属の水準器でベースを必ず水平に調整する。



3. コームホルダーにセットする。
電極用コーム： 両サイド2本
サンプル用コーム： 12本



4. 0.75 gのアガロースに対し、35 mLの1×TBEとエチジウムブロマイドを加える。
(2.5%アガロース/1×TBE/エチジウムブロマイド)

4・1 電子レンジで、ゲルを粒子が完全に見えなくなるまで溶解する。突然の沸騰に注意

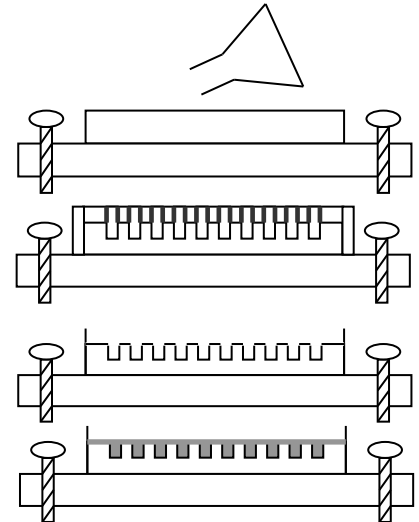
4. 2 アガロース溶解液を十分に熱した状態で、0.5 µg/mLになるようにエチジウムブロマイド添加する。

5. ゲルボックスに静かに流し込みます。
ゲル表面に**気泡が出来ないように**注意。

6. コームホルダーを静かにはめ込み、室温で15分間静置。
室内空調の風が当たらないよう注意

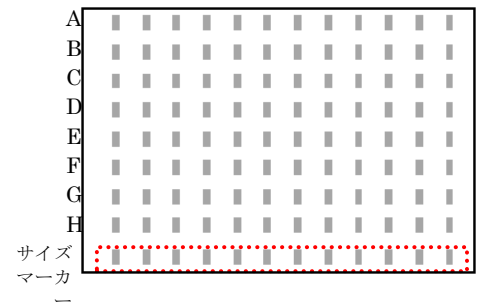
7. コームホルダーを静かに外します。

8. 10 mLのエチジウムブロマイド入りの1×TBEを泳動槽に満たす。

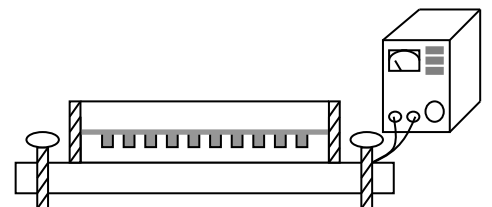


2.2.3 検体の泳動

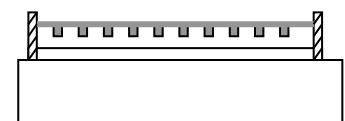
1. PCR産物10 µL全量をアガロースゲル上の各ウェルに8連ピペットを使用し分注する。
2. 泳動前にサイズマーカーを左図のウェルに10 µLずつ分注。
One Lambda社マイクロSSPサイズマーカー(#SSP-SM)
50、150、300、500、750 (1000) bp



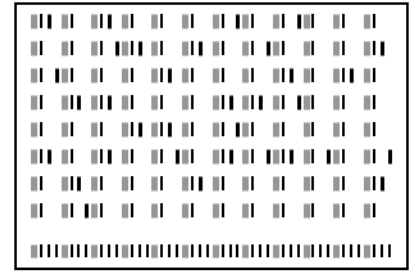
3. カバーをゲルボックスにのせ、コードをパワーサプライに接続し、定電圧150Vにセットする。
赤色マーカーが5 mm泳動したらスイッチを切る。(約3~5分で泳動は完了)



4. カバーを外した後、ゲルボックスをベースから外す。

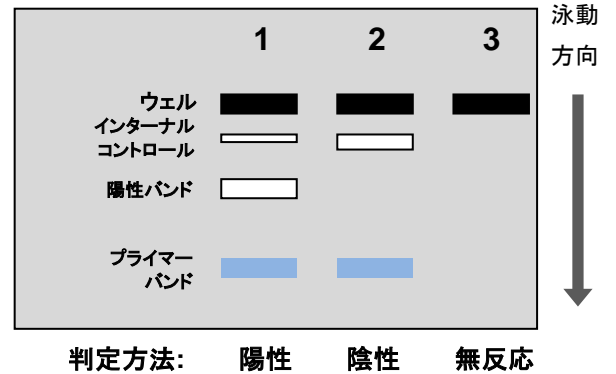


5. ゲルボックスをトランスイルミネーターに置く。
(ゲルをゲルボックスから取り出す必要はない)
6. コントロールバンド・特異バンドを確認し、写真撮影する。
紫外線を直視しないように注意。



2.2.4 判定

1. インターナルコントロールバンドは、増幅反応の対照として陰性コントロール反応と一部の陽性タイプ反応を除き必ず出現する。 インターナルコントロールバンドが出現しない反応（無反応）が検出された場合、その検体のタイピング結果は無効となる。 ただし、陽性バンドが増幅されたPCR反応には、インターナルコントロールバンドが出現しない、あるいは弱く出現する場合がある。



2. 陽性反応の場合はインターナルコントロールバンドより速く泳動するバンドが出現する。
3. 陽性反応が検出されたウェルの位置をOne Lambda社 HLASSP判定用ソフトウェアのインストールされたパソコンに入力し、判定されたアليل、サイズマーカーとの対比による泳動距離に矛盾がない事を確認し、判定する。
マイクロSSPワークシート情報はタイピングトレーのロット番号により変わる場合があるので、**キットとワークシート情報のロット番号が同じであることを必ず確認する。**

3. トラブルシューティング:

トラブル頻度が高い、マイクロSSPゲルシステムを使用した電気泳動方法に関する問題を記載した。電気泳動を使用した実験結果は検体の量や純度、また撮影方法などに大きく影響される。

トラブル	原因	解決法
電気泳動が起これない。	パワーサプライの電源が切れている。	電源を入れていることを確認。
	パワーサプライが正しく設定されていない。	定電圧150Vに設定する。
	接続プラグがパワーサプライにしっかりと接続されていない。	赤色と黒色の両コードそれぞれ色を合わせて、しっかりと接続。
	カバー両側の安全スイッチが切れている。	<ul style="list-style-type: none"> ゲルボックスをカバーで覆う際、安全スイッチの音が聞こえるまでカバーをベースにしっかりと押し付ける。 安全スイッチが正しく作動している事を確認する。ベースの陰極側（赤サイド）にある金属製のネジが折れていたり、低くなっていない事を確認する。
	バッファの量が足りない。	10 mLの1×TBEバッファを使用し、ゲル内の全てのウェルを満たす。
	電極に汚れが付着している。	<p>カバー内のプラチナ線が付着物（バッファの塩分など）や他の汚れで覆われていないことを確認する。</p> <p>（電極を取り扱う際は、必ずパワーサプライの電源を切り、接続プラグを外して行う。）</p>
	接触不良あるいは、配線が破損している。	メーカーに連絡して対応を相談する。
バンドが検出されない。	アガロースの濃度または品質が正しくない。	2.5%の核酸電気泳動用アガロースを使用します。 （マイクロSSPタイピングキット使用の場合のみ）
	バッファの処方が正しくない。	エチジウムブロマイド（EtBr）を含む1×TBEバッファをゲルの作製と電気泳動用のバッファとして使用する。
	エチジウムブロマイドの濃度が正しくない。	1X TBEバッファのエチジウムブロマイドの濃度を0.5 µg/mLに調製する。 エチジウムブロマイドを含んだ試薬は遮光管理をして保存する。
	試薬の使用期限が過ぎている。	電気泳動用バッファとアガロース溶解液はエチジウムブロマイドを含んでいるため、遮光管理をして保存する。特にアガロース溶解液は1日以内に使い切れる量を作製する。

	泳動時間が長すぎる。	マイクロSSPタイピングキット使用の場合は2.5%アガロース溶液を使用し、赤色素が5 mm泳動したところで電圧を切る。(2.5%以外のアガロース溶解液を使用した場合、泳動距離の調整が必要です。)アガロースの質と量により泳動時間が変わりますので、必ず色素の泳動距離を基準に泳動を止める。
	紫外線イルミネーターの設定が正しくない。	312 nmの紫外線を使用します。紫外線ランプが切れていないか確認する。
	カメラの設定が正しくない。	紫外線撮影用のフィルターを使用しする。絞り、シャッタースピードなどカメラの露出設定が正しいか確認する。
バンドが弱く検出された。 (「バンドが検出されない」のセクションも参照)	エチジウムブロマイドの濃度が足りない。	エチジウムブロマイドの濃度を0.5 µg/mLにし、新しい試薬を作製する。
	ゲルが薄く作製されたため、サンプルが泳動中に漏れてしまう。	30 mLのアガロース溶解液を使用する。
	ゲルの厚さが均等でないために、サンプルが泳動中に漏れてしまう。	ゲルボックスをしっかりとベースにはめ込む。ゲルの作製直前にアガロース溶解液を十分に熱してから注入する。アガロースを注入後、ゲルの厚さが均等になるようベースを傾ける。コームホルダーを付けた後、再度ベースが水平であるか、確認する。
	バッファの量が足りない。	10 mLのバッファを使用し、電極用ウェルを含む全てのウェルをバッファで満たす。
第12列目のシグナルが弱く検出された	※「バンドが弱く検出された」のセクションを参照。	
バンドの形が異常	ウェルが変形している。	<ul style="list-style-type: none"> ゲルは最低15分間凝固させる。15分以上放置した場合、ゲルが乾燥し、バンドの形が異常になる場合がある。 コームホルダーを付けた後、全てのコームがしっかり差し込まれていることを確認する。
	バッファが蒸発している。	ゲルにバッファを加えた後、速やかに使用する。放置時間が長いと、バッファが蒸発し、泳動が正常に行われなない。
	ベースが水平でない状態で泳動が行われています。	ベースを水平にする。
	電流が均等でない。	電極に汚れが付着しているか確認する。汚れが付着している場合はペットチップの先端（非金属材料）で取り除く。
	ゲル内に気泡がある。	アガロース溶解液を注入直後、気泡を取り除く。
	ゲル内に異物がある。	ゲルボックスの汚れ（埃り、乾燥したアガロースなど）を取り除く。
	コームが破損している。	コームを取り替える。
	アガロースが完全に溶解されていない。	アガロース溶解液を十分に熱してから使用する。

4 注意事項:

- **PCR 後専用のピペットを、PCR 前の操作には絶対に使わない。**
- D-Mix には pH 指示薬が含まれており、細菌のコンタミ等により pH が低下しますと溶液が黄色く変色する。黄色く変色した D-Mix は使用しない。
- D-Mix に沈殿が生じたときは、室温に戻し、ボルテックスで混和し沈殿物を溶かしてから使用する。
- エチジウムブロマイド (EtBr) は発癌性物質。エチジウムブロマイドを含んだ試薬、ゲルの処理には必ず手袋を着用。
- 紫外線トランスイルミネーターを使用するときは必ずゴーグルを着用。