

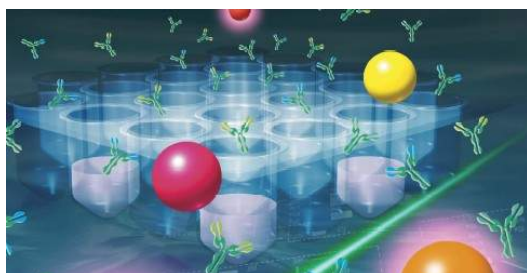


# WAKFlow<sup>®</sup> HLA 抗体

## クラス I (ICFA)

### 操作説明書

—第2版—



改訂：2010年8月

作成：2009年2月



湧永製薬株式会社

# 目 次

---

1. 測定原理 .....	1
2. 製品内容（キットの構成） .....	2
3. 使用手順 .....	2
3.1 操作上の注意事項 .....	2
3.2 必要な装置・器具 .....	3
3.3 操作方法 .....	4
3.4 測定結果の判定法 .....	6
4. 使用上又は取扱い上の注意 .....	6
《貯蔵方法》 .....	7
《有効期間》 .....	7
《包装単位》 .....	7
《問い合わせ先》 .....	7
別紙	
フローシート <b>WAKFlow<sup>®</sup></b> HLA 抗体クラス I（ICFA）-原理と操作概要	

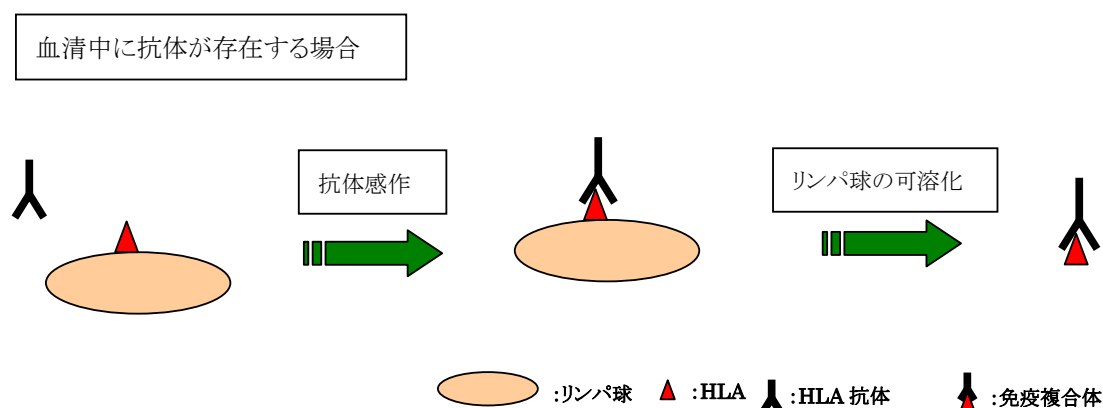
## 1. 測定原理

**WAKFlow<sup>®</sup> HLA 抗体クラス I (ICFA)**は、Luminex 社 (<http://www.luminexcorp.com>) の xMAP<sup>®</sup> Technology (蛍光ビーズ法) を用いて、血液細胞上の HLA クラス I 抗原に反応した抗体を高感度に検出する研究用試薬で、交差適合性試験に応用できます。

操作は以下の2つのステップから成ります。

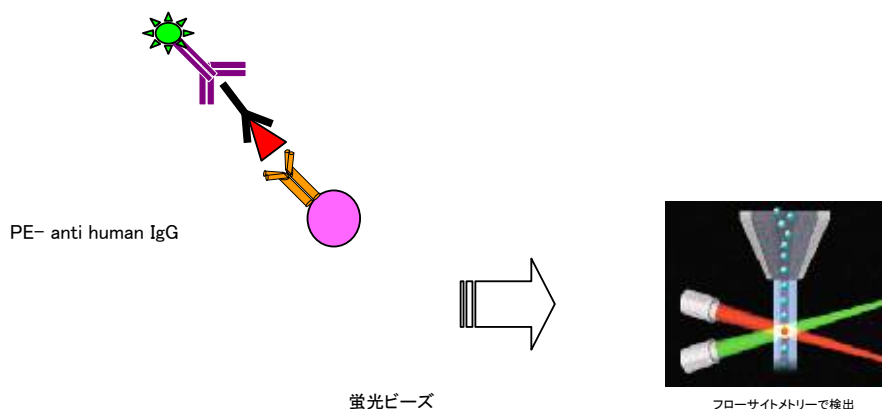
### I) 白血球の抗体感作及び可溶化

HLA クラス I 抗原を発現している血液細胞と検体血清とを反応させます。検体血清中に血液細胞上の HLA に対する抗体が存在する場合には、HLA とその抗体との複合体が形成されます。細胞を可溶化すると、形成された複合体が遊離します。



### II) 蛍光ビーズ、標識抗体の反応及び検出

遊離した複合体を、HLA クラス I 抗原に対するモノクローナル抗体がそれぞれ固定された蛍光ビーズと反応させ、蛍光ビーズ上に複合体を捕捉します。これに、標識抗体 (PE 標識 Goat anti human IgG) を反応させ、HLA 抗体が結合した蛍光ビーズには PE 標識抗体が結合します。蛍光ビーズと標識抗体による蛍光シグナルから HLA 抗体の存在の有無を判定します。



## 2. 製品内容（キットの構成）

本製品の構成試薬およびその貯蔵方法は、下記のとおりです。

これらの構成試薬は、異なる製造番号の製品の構成試薬と組み合わせて使用しないで下さい。

96 テスト／キット

- |   |                      |              |
|---|----------------------|--------------|
| ① | ビーズミックス .....        | 1mL × 1 本    |
| ② | 10 倍濃度溶血試薬 .....     | 5mL × 1 本    |
| ③ | 10 倍濃度洗浄液 I .....    | 10mL × 1 本   |
| ④ | 10 倍濃度洗浄液 II .....   | 25mL × 1 本   |
| ⑤ | 10 倍濃度 Lysis 液 ..... | 3mL × 1 本    |
| ⑥ | 10 倍濃度 PBS .....     | 3mL × 1 本    |
| ⑦ | 標識抗体.....            | 0.12mL × 1 本 |
| ⑧ | 陰性コントロール血清 .....     | 2mL × 1 本    |

〔貯蔵方法〕

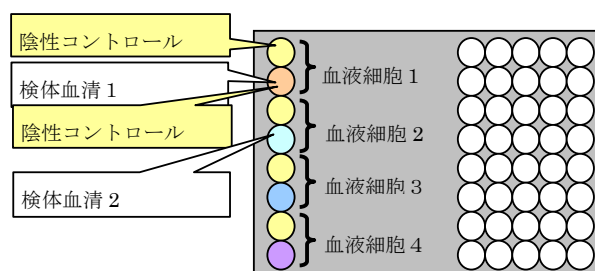
- ・ すべての試薬は 2～8℃で保存して下さい。
- ・ ①ビーズミックス、⑦標識抗体は、遮光して保存して下さい。

## 3. 使用手順

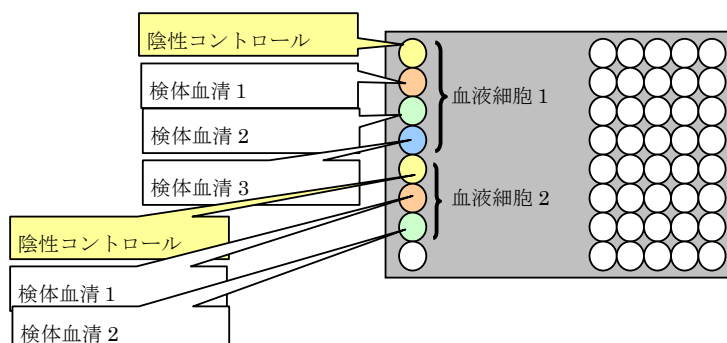
### 3. 1 操作上の注意事項

1. すべての操作は、できるだけ光が当たらないように注意して行って下さい。
2. 検体血清中にはウイルス、細菌等の感染性のものが含まれている恐れがありますので、感染防止のため、操作の際はご留意下さい。（後述）
3. 本試薬では血液細胞と検体血清中 HLA 抗体の反応強度を陰性コントロール血清と比較します。そのため検体毎に陰性コントロール血清を使用する必要があります。下図のような検体レイアウトで測定してください。

<血液細胞に 1 種類の検体血清を反応させる場合>



<血液細胞に複数の検体血清を反応させる場合>



### 3. 2 必要な装置・器具

#### (1) ビーズミックスと検体血清反応及び標識抗体による標識反応

- ・ 96 穴 V 底及び 96 穴 U 底プレート

■以下のプレートを推奨いたします。

- ・ 96 穴 V 底プレート (Nunc、商品番号#442587)
- ・ 96 穴 U 底プレート (Corning、商品番号#3798)
- ・ マイクロピペット (可変式:  $1\sim 20\mu\text{L}$ ,  $10\sim 200\mu\text{L}$ ,  $100\sim 1000\mu\text{L}$ )
- ・ マルチチャンネルピペット (あると便利)
- ・ 連続分注機 (あると便利)
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ プレートミキサー
- ・ マイクロプレート遠心分離機 ( $1,300\times g$  で使用可能なもの)
- ・  $37^{\circ}\text{C}$  恒温水槽



マイクロピペット



マルチチャンネルピペット



連続分注器



ボルテックスミキサー



プレートミキサー



マイクロプレート遠心分離機



$37^{\circ}\text{C}$  恒温水槽

#### (2) 検出と解析

- ・ Luminex システム
- ・ パーソナルコンピュータ



### 3. 3 操作方法

#### 3.3.1 準備

##### (1) ビーズの処理

① **ビーズミックス**をボルテックスにより、しっかりと攪拌しておきます。

##### (2) 洗浄液の調製

- ②～⑥の**各試薬**に析出物がある場合は 37℃以下で加温して溶解し、析出物がなくなったことを確認します。
- ②～⑥の**各試薬は 10 倍濃度となっていますので、精製水で 10 倍に希釈して使用します**。希釈調製した各試薬は、2～8℃で保存し、1 週間以内に使用して下さい。

(3) Luminex 装置：ウォームアップを行います。

#### 3.3.2 操作手順

##### (1) 白血球の抗体感作および可溶化

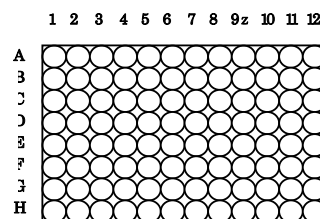
96 穴プレートあるいは 1.5mL サンプルチューブを使用して行います。

※ 以下の操作は、感染防止のため手袋を着用して行って下さい。

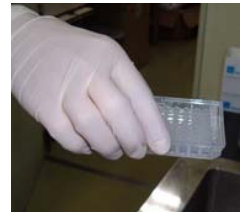
##### 〈96 穴プレートを使用する場合〉

- 96 穴 U 底プレートに**溶血試薬:200  $\mu$  L**を陰性コントロール血清用と検体血清用として、1 検体あたり 2 ウェルずつ分注します。

■ A1:陰性コントロール血清、B1:被検血清 1、  
C1:陰性コントロール血清、D1:被検血清 2、  
…、の順で添加します。



- EDTA 加全血:20  $\mu$  L**を添加します。ボルテックスにより攪拌した後、37℃恒温水槽で、10 分間インキュベートし、溶血反応を行います。
- 2,000×g で 2 分間遠心分離を行います。
- スナッピングにより上清を除去し、ペーパータオル等で余分な水分を良く吸い取ります。



- ボルテックスをして、白血球のペレットを再浮遊させます。
- 洗浄液 I :200  $\mu$  L**を添加します。しっかりシールした後、2,000×g で 2 分間遠心分離を行います。
- スナッピングにより上清を除去し、ペーパータオル等で余分な水分を良く吸い取ります。



- 8) ボルテックスをして、白血球のペレットを再浮遊させます。
- 9) 5)～7)までの操作を再度行います。
- 10) 各ウエルに **PBS:60  $\mu$  L** を分注します。
- 11) 該当する各ウエルに⑧**陰性コントロール血清:20  $\mu$  L**、または**被検血清:20  $\mu$  L** をそれぞれ分注します。
- 12) しっかりシールをした後、プレートミキサーを用いて懸濁します。37℃恒温水層で 30 分間インキュベートします。
- 13) 反応液が隣のウエルに混入しないよう注意しながら、慎重にシールをはがします。
- 14) 各ウエルに**洗浄液 II :200  $\mu$  L** を添加し、2,000 $\times g$  で 2 分間遠心分離を行います。
- 15) スナッピングにより上清を除去し、ペーパータオル等で余分な水分を良く吸い取ります。
- 16) ボルテックスをして、白血球のペレットを再浮遊させます。
- 17) 13)～15)までの操作を再度行います。
- 18) 各ウエルに **Lysis 液:50  $\mu$  L** を添加します。しっかりシールをした後、25℃、10 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。

■ 反応を行っている間に、Luminex システムの測定準備をしておきます。



- 19) 2,000 $\times g$  で 5 分間遠心分離し、上清を得ます。

#### 〈1.5mL サンプルチューブを使用する場合〉

- 1) 1.5mL サンプルチューブに**溶血試薬:200  $\mu$  L** を分注し、**EDTA 加全血:20  $\mu$  L** を添加します。ボルテックスにより攪拌した後、37℃恒温水槽で、10 分間インキュベートし、溶血反応を行います。



- 2) 2,000 $\times g$  で 2 分間遠心分離を行います。
- 3) 上清を除去します。
- 4) **洗浄液 I :200  $\mu$  L** を添加します。しっかりフタを閉めボルテックスをして、白血球のペレットを再浮遊させた後、2,000 $\times g$  で 2 分間遠心分離を行います。
- 5) 上清を除去します。
- 6) 4)、5)の操作を再度行います。
- 7) 各チューブに **PBS:60  $\mu$  L** を分注します。
- 8) 該当する各チューブに⑧**陰性コントロール血清:20  $\mu$  L** と**被検血清:20  $\mu$  L** をそれぞれ分注します。
- 9) しっかりフタを閉め、ボルテックスにより攪拌した後、37℃恒温水層で 30 分間インキュベートします。
- 10) 各チューブに**洗浄液 II :200  $\mu$  L** を添加します。2,000 $\times g$  で 2 分間遠心分離を行います。
- 11) 上清を除去します。
- 12) 10)、11)の操作を再度行います。

- 13) 各チューブに **Lysis 液:50 $\mu$ L** を添加します。しっかりフタを閉めた後、25℃、10 分間ミキサーを用いて攪拌し続けます。
- 14) 10,000 $\times g$  で **5 分間**遠心分離し、上清を得ます。

■ 反応を行っている間に、Luminex システムの測定準備をしておきます。

## (2) 蛍光ビーズおよび標識抗体の反応

※ 以下の操作は、感染防止のため手袋を着用して行って下さい。

※ 以下の操作は、96 穴 V 底プレートを用いて行います。

- 1) サンプル数に応じた数の 96 穴 V 底プレートの各ウェルに①**ビーズミックス:5 $\mu$ L** を分注します。
- 2) 各ウェルに (1) で得られた可溶化白血球の上清:25 $\mu$ L を陰性コントロール血清、被検血清の順に添加します。

■ この際、沈殿を巻き込まないように、注意深く上清をピペットで取ります。  
沈殿を巻き込んでしまうと、測定の際にルミネックス機器のニードルが詰まり、測定できなくなる場合があります

- 3) しっかりシールをした後、遮光（遮光できるインキュベータ内、あるいはアルミホイル等で覆う）して、25℃、20 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。
- 4) 反応液が隣のウェルに混入しないよう注意しながら、慎重にシールをはがします。
- 5) 各ウェルに**洗浄液Ⅱ:200 $\mu$ L** を添加し、2,000 $\times g$  で 2 分間遠心分離を行います。

■ 遠心分離を行っている間に、⑦**標識抗体**を④**洗浄液Ⅱ**で 100 倍に希釈しておきます。



- 6) スナッピングにより上清を除去し、ペーパータオル等で余分な水分を良く吸い取ります。
- 7) ボルテックスをして、蛍光ビーズを再浮遊させます。
- 8) 各ウェルに⑦**標識抗体**を**洗浄液Ⅱ**で 100 倍に希釈した**標識抗体:50 $\mu$ L** を添加します。
- 9) しっかりシールをした後、遮光（遮光できるインキュベータ内、あるいはアルミホイル等で覆う）して 25℃、10 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。
- 10) シールに付着した反応液が隣のウェルに混入しないよう注意しながら、慎重にシールをはがします。
- 11) 各ウェルに**洗浄液Ⅱ:200 $\mu$ L** を添加し、2,000 $\times g$  で 2 分間遠心分離を行います。
- 12) スナッピングにより上清を除去し、ペーパータオル等で余分な水分を良く吸い取ります。
- 13) ボルテックスをして、蛍光ビーズを再浮遊させます。
- 14) 10)、11) の操作を再度行います。
- 15) 各ウェルに**洗浄液Ⅱ:75 $\mu$ L** を添加します。ビーズの塊が見える場合は、シールをしてボルテックスにより分散させて下さい。



### (3) 測定

Luminex システムを用いて、ビーズミックスの Lot 番号に対応したテンプレートファイルを使用して測定を行います。またその際、Luminex XYP の温度設定が OFF になっていることを確認して下さい。

■ 検体をすぐに測定しない場合は、暗所に保管して下さい。



## 3. 4 測定結果の判定法

測定結果の CSV ファイルを、「**WAKFlow® ICFA 解析ソフトウェア**」で判定します。本ソフトウェアでは、各ビーズの蛍光シグナルからインデックス値を算出し判定します。試薬ご購入の際、無償にて提供いたします。

## 4. 使用上又は取扱い上の注意

### 1. 一般的注意事項

- ・本品は研究用試薬です。疾病の治療や診断を目的として使用しないで下さい。
- ・使用期限を過ぎた試薬は使用しないで下さい。
- ・試薬類を飲んだりなめたりしないで下さい。試薬が皮膚に付着したり、目や口に入ったりしないよう十分に注意して下さい。また誤って皮膚に付着したり、目や口に入ったりした場合は、直ちに水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、異常があれば医師に相談して下さい。

### 2. 使用者の危険防止に関する注意事項

#### (1) ウイルス、細菌

- ・EDTA 加全血および検体血清中にはウイルス、細菌等の感染性のものが含まれている恐れがあるものとして取扱い、専用エリアで操作して下さい。
- ・使用するピペットおよびチップはエリア専用として下さい。
- ・エリア専用の作業着を着用し、使い捨てのプラスチック手袋をご使用下さい。
- ・作業終了後は実験台を 0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液（家庭用の塩素系漂白剤を 10 倍に希釈したもの）で拭いて下さい。
- ・実験台等に血清が付着した場合は、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で拭いて下さい。

#### (2) 廃棄物に関する注意事項

血液・血清を使用したものは、オートクレーブ後廃棄して下さい。あるいは医療用廃棄物として廃棄して下さい。医療用廃棄物としての廃棄方法は、各実験施設の廃棄方法に従って下さい。

### 3. その他の注意事項

本製品は、改良のため予告なく仕様を変更することもありますのでご了承下さい。

《貯蔵方法》

2～8℃に保存

《有効期間》

12 ヶ月（使用期限は外箱に記載）

《包装単位》

96 テスト

《お問い合わせ先》

湧永製薬株式会社 バイオ事業開発部

〒739-1195 広島県安芸高田市甲田町下甲立 1624

TEL: (0826) 45-4625

FAX: (0826) 45-4624

e-mail: wakunaga-hla@wakunaga.co.jp

URL: <http://www.wakunagahla.jp/>

受付時間 9 時 ～ 12 時、13 時～17 時（月～金曜日、但し祝日を除く）



製造販売元

**湧永製薬株式会社**

広島県安芸高田市甲田町下甲立1624

本社：大阪市淀川区宮原4丁目5-36

<http://www.wakunaga.co.jp/>