



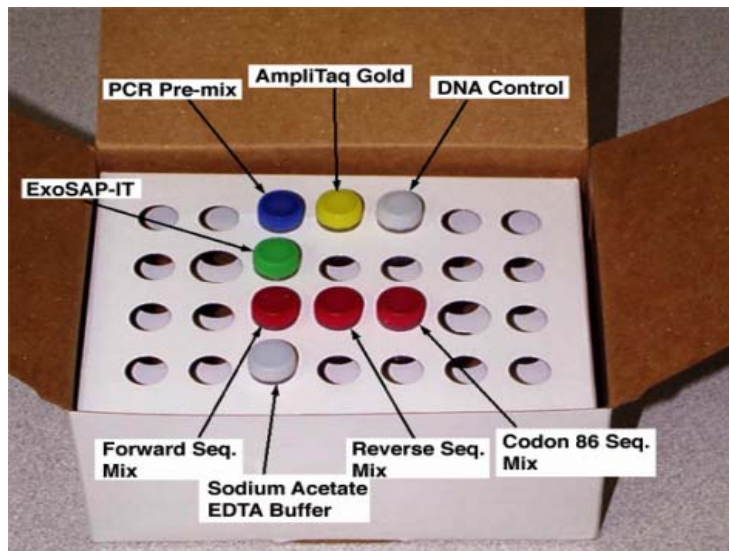
AlleleSEQR HLA-SBT試薬

研究用試薬

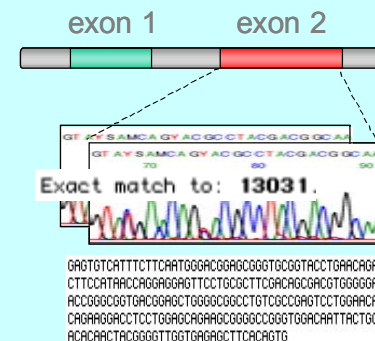
アボットモレキュラー事業開発部

I. 製品概要 - 1

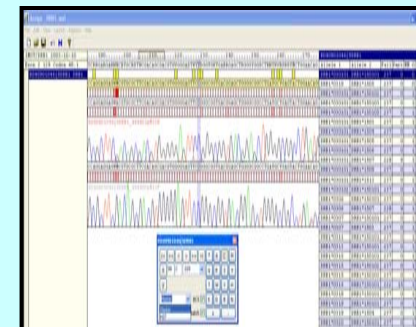
Allele SEQR HLA SBT試薬は、シーケンシングで塩基配列を直接解析し、HLA型(アリル)を同定するための研究用試薬です。コアキットには、対象となるエクソンのPCR試薬とそのシーケンス試薬で構成されています。



HLASBT試薬を用い、塩基配列を直接解析



Assign解析ソフトウェアでアリルの同定



I. 製品概要 - 2

Allele SEQR HLA SBT試薬は、6つのコアキット(HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1)と、Heterozygous Ambiguity を解消するための補助シーケンスプライマー試薬からなります。

| | | |
|------------------|--------------------------|----------------|
| コアキット | AlleleSEQR HLA-A | Exon 2, 3, 4 |
| | AlleleSEQR HLA-B | Exon 2, 3, 4 |
| | AlleleSEQR HLA-C plus | Exon 2, 3, 4 |
| | AlleleSEQR HLA-DRB1 | Exon 2 |
| | AlleleSEQR HLA-DQB1 | Exon 2, 3 |
| | AlleleSEQR HLA-DPB1 | Exon 2 |
| 補助シーケンス プライマー | AlleleSEQR HARPs (全34種類) | |
| | HLA-C plus用 (全5種類) | Exon 1, 5, 6,7 |
| | | |

Allele SEQR HARPs (Heterozygous Ambiguity Resolution Primer)とは？

Allele SEQR HLA コアキットのみでは判定できないアリの組み合わせ(Heterozygous Ambiguity)を解消するために、設計されたシーケンスプライマーです。コアキットのデータと合わせて解析することでAmbiguityを大幅に解消できます。

Allele SEQR HARPs(全34種類)は、単品でのパッケージとなっております。

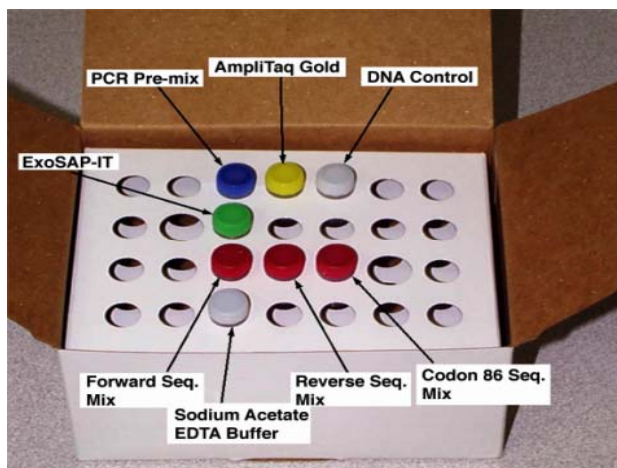
II. 製品の特徴

1. Complete Kits!! 必要な試薬が全て入っています。
2. Class I (A, B, C), Class II (DR, DP, DQ)のタイピングが可能
3. 簡便な全ローカス共通プロトコール
4. Assign HLA ソフトの利用で、HLAタイピング作業の効率化
5. AlleleSEQR HARPsの利用でAmbiguityを大幅に解消

III. コアキット構成

Complete Kits!! 必要な試薬が全て入っています。

例) DRB1 構成試薬



★ ■ DNAコントロール

■ PCR Pre-mix : PCRプライマー

■ AmpliTaq Gold: ポリメラーゼ(増幅)

★ ■ PCR Clean-up Reagent: PCR生成物を精製

▶ exonuclease(反応しなかった一本鎖を分解)

▶ alkaline phosphatase(リン酸基を分解)

■ Sequencing mix(F, R)

★ ■ Sodium Acetate+EDTA Buffer: シークエンス産物を精製

▶ Sodium Acetate(DNA, RNAを沈殿)

▶ EDTA

★ ■ Codon 86: DRB1のキットのみ

■ Codon 85: DPB1のキットのみ

IV. ワークフロー

1. DNAサンプルの調整
(20 ng/ul in Tris/EDTA; Class I 40 ng; Class II 80 ng)
2. DNAの増幅(PCR反応) (150 min)
3. PCR産物の精製 (30 min)
4. シーケンシング反応 (60 min)
5. シーケンシング反応物の精製 (40 min)
6. 電気泳動 (DNA シーケンサー)
7. 解析 (Assign ソフト)

V. プロトコール “事前準備”

簡便な共通プロトコール(A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1)

スペクトラーキャリブレーション

- BigDye Terminator v1.1 スペクトラーキャリブレーション済み
version 1.1 BigDye Terminator Sequencing Standard (ABI # 4304154)
- Data Collection ソフトのDye Set E 及びMobility File DT3100POP6(BD)v2.mobの確認

泳動設定

キャピラリー長さ 36 cm

Mobility file - DT3100POP6(BD)v2

Run Module – RapidSeq36_POP6_Default

Injection – 1.0 to1.5 kV Injection Voltage, 5 to10 s Injection Time

Collection Parameters – 1800 seconds

補足: 当試薬はAppliedbiosystems社 3100 DNAシーケンサーで検証されておりますが、その他のモデルでも使用可能です。(機種については別途弊社までお問い合わせください。)

VI. 共通プロトコール (PCR)

PCR

1. PCR 増幅反応を行う直前に、新しく PCR Premix と AmpliTaq Gold を Tube に調整する

| HLA-A, -B, -C | | | HLA-DRB1, -DPB1, DQB1 | | |
|---------------|------------------|--------------------|-----------------------|------------------|--------------------|
| 反応数 | PCR－ Premix 量 | AmpliTaq Gold 量 | 反応数 | PCR－ Premix 量 | AmpliTaq Gold 量 |
| 1 | 16 µL | 0.3 µL | 1 | 8 µL | 0.1 µL |
| 5 | 80 µL | 1.5 µL | 10 | 80 µL | 1.0 µL |
| 10 | 160 µL | 3.0 µL | 25 | 200 µL | 2.5 µL |
| 25 | 400 µL | 7.5 µL | 100 | 800 µL | 10 µL |

2. 適切な PCR/Taq Mix 量を PCR チューブまたは Wellplate に分注する

| | |
|-----------------------|-------|
| HLA-A, -B, -C | 16 µL |
| HLA-DRB1, -DPB1, DQB1 | 8 µL |

3. DNA(20 ng/µL)又は滅菌蒸留水(陰性コントロールチューブ)を加える

| | |
|-----------------------|------|
| HLA-A, -B, -C | 4 µL |
| HLA-DRB1, -DPB1, DQB1 | 2 µL |

4. 軽く遠心する(5Sec)

VI. 共通プロトコール (PCR)

5. PCR 増幅条件を設定し PCR を行う

| サイクル数 | 温度 | 時間 |
|-------|-------|------|
| 1 | 95 °C | 10 分 |
| 36 | 96 °C | 20 秒 |
| | 60 °C | 30 秒 |
| | 72°C | 3 分 |
| 1 | 4 °C | — |

VI. 共通プロトコール (PCR産物精製)

PCR 産物の精製

1. PCR Clean-up 処理によって余分の PCR プライマー及び dNTP を除去する
HLA-A, -B, -C PCR 産物そのまま使用
HLA-DRB1, -DPB1, DQB1 TE-4 又は滅菌蒸留水で 2 : 1 で希釈
(10 µL PCR 産物に 20 µL 希釈液を加える)
2. 各チューブに 3 µL ExoSAP-IT を加えて、軽く攪拌し遠心する
3. PCR 装置にて加熱する

| サイクル数 | 温度 | 時間 |
|-------|-------|------|
| 1 | 37 °C | 15 分 |
| 1 | 80 °C | 15 分 |
| 1 | 4 °C | — |

VI. 共通プロトコール (シーケンシング反応)

シーケンシング反応

1. ローカスに必要なシーケンシング反応チューブを準備する

| Class I HLA | | | Class II HLA | | |
|-------------|---------|---------|--------------|----------|---------|
| A | B | C | DRB1 | DPB1 | DQB1 |
| Exon 2F | Exon 2F | Exon 2F | Exon 2F | Exon 2F | Exon 2F |
| Exon 2R | Exon 2R | Exon 2R | Exon 2R | Exon 2R | Exon 2R |
| Exon 3F | Exon 3F | Exon 3F | Codon 86 | Codon 85 | Exon 3F |
| Exon 3R | Exon 3R | Exon 3R | | | Exon 4F |
| Exon 4F | Exon 4F | Exon 4F | | | |
| Exon 4R | Exon 4R | Exon 4R | | | |

2. 各チューブに 8 μ L シーケンシング試薬を分注する
3. 2 μ L ExoSAP-IT 処理済みの PCR 産物を添加し、軽く遠心する
4. PCR 装置にてシーケンシング反応を行う

| サイクル数 | 温度 | 時間 |
|-------|-------|------|
| 25 | 96 °C | 20 秒 |
| | 50 °C | 30 秒 |
| | 60 °C | 2 分 |
| 1 | 4 °C | — |

VI. 共通プロトコール (シーケンシング産物の精製)

エタノール沈殿によるシーケンシング反応産物の精製

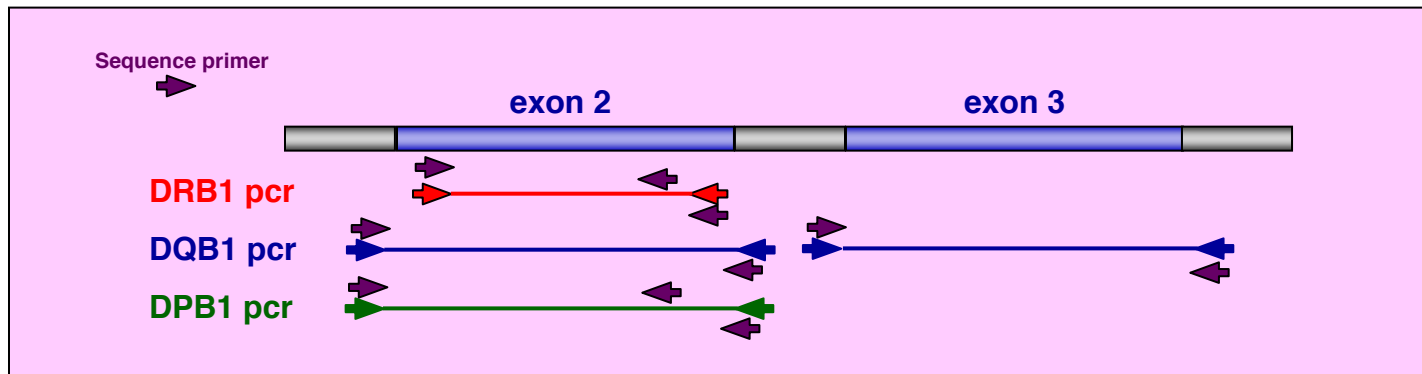
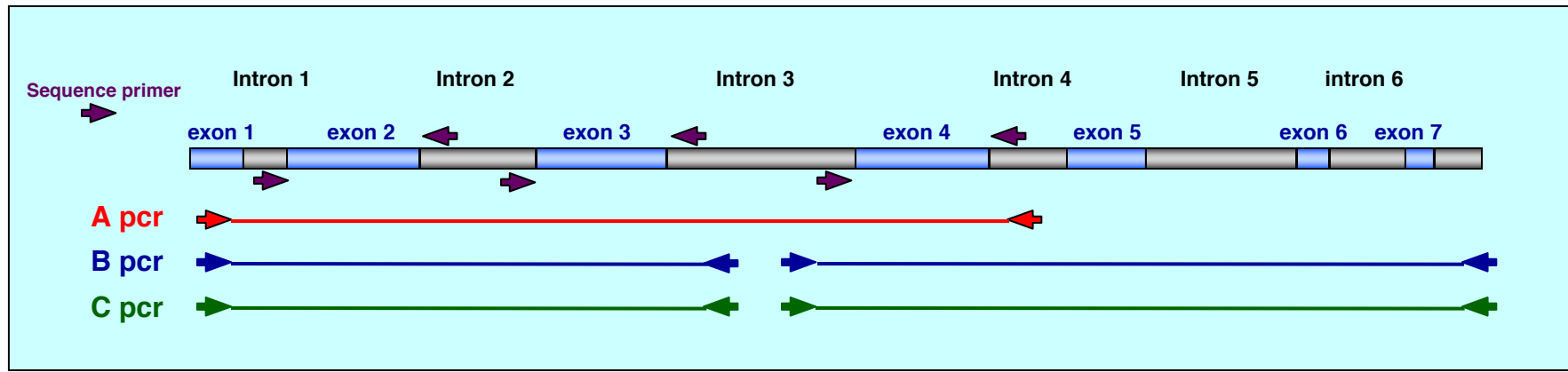
1. シーケンシング反応チューブに 2 μ L NAOAc/EDTA を分注し 500 x g、30 秒で遠心する
2. 25 μ L 100% エタノールを加え、15 秒ぐらい激しく攪拌する（要注意：必ず激しい攪拌を行うこと！！）
3. 2000 x g、30 分で遠心する
4. 96 ウエルトレイを逆さまにしペーパータオルに軽く叩き上清を除去して、遠心する（50-100 x g、10 秒）
5. 50 μ L の 80% エタノールを加え、遠心する（2000 x g、5 分）
6. 再び PCR トレイを逆さまにし、ペーパータオルに軽く叩き上清を除去してから遠心する（50-100 x g、10 秒）

VI. 共通プロトコール (電気泳動)

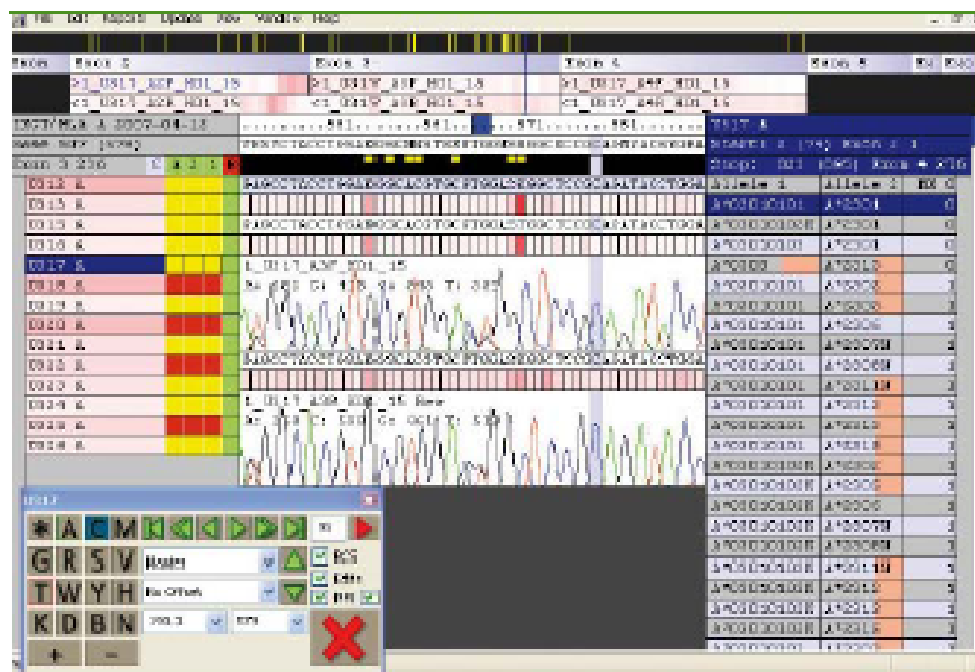
電気泳動

1. 精製したシーケンシング反応産物に 1.5 uL HiDi ホルムアミドを加え、軽く遠心してからサマーマルサイクラーにて 95°C、2 分間加熱変性する。
2. 2-3 分間冷やし DNA シーケンサで泳動する

VII. PCRターゲット領域



VIII. Assign 解析ソフト



- HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1すべてを自動解析
- 複数検体、複数ローカスの解析が一度に行える
- HLA libraryは定期的にアップデート
- 簡便な操作で塩基配列の確認・編集
- AlleleSEQR HARPsの利用でAmbiguityを大幅に解消

