



# すぐに役立つHLA Vol.4 LABType試薬の原理と手技

株式会社ベリタス

2023/03/02

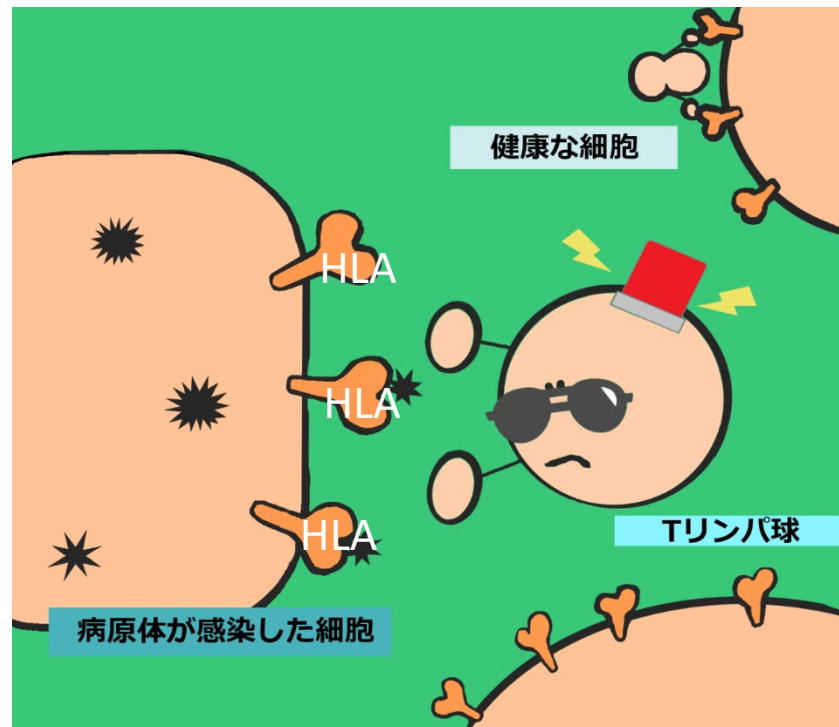
# 目次

- HLAとは
- LABType試薬とは
- 手技のポイント

# HLAとは

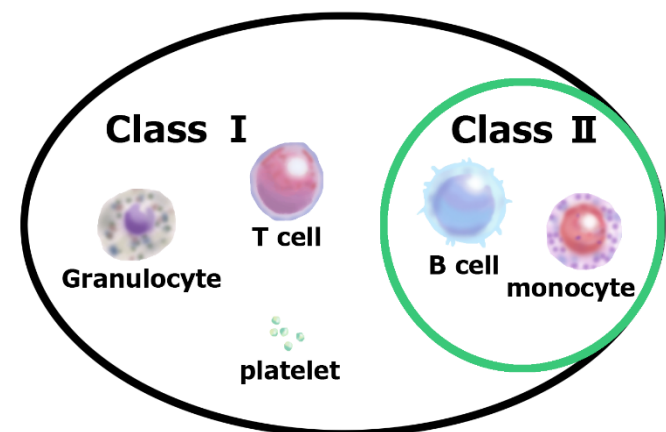
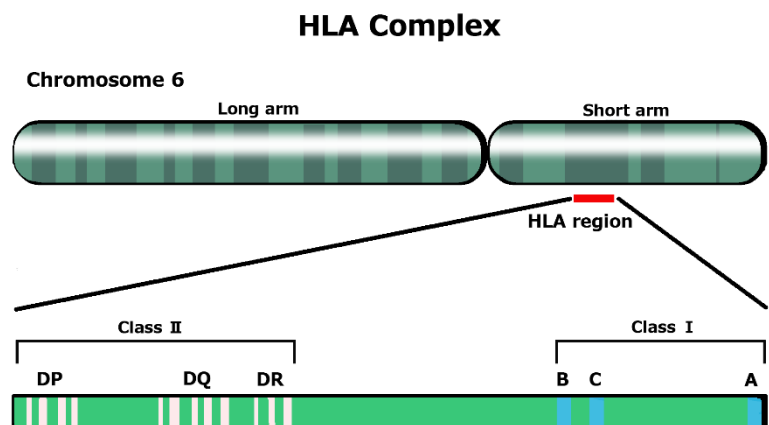
# HLAの役割

- 様々な細胞の表面に発現している抗原
- 病原体に感染したり、移植等により外来抗原が入ってきた際に細胞外に外来抗原を提示



# HLA(Human Leukocyte Antigen)

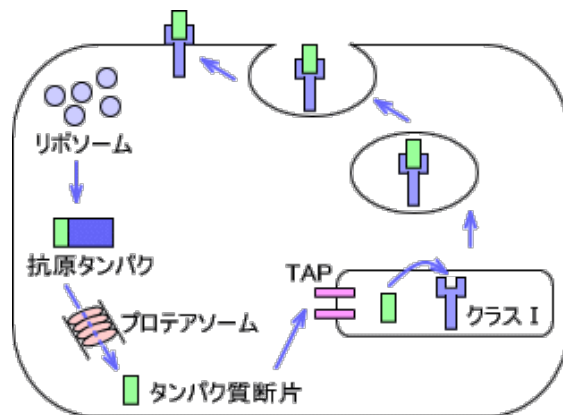
- 第6染色体の短腕部に存在
- A, B, C, DR, DQ, DPなど多くの抗原で構成
- ヒト白血球抗原として発見されたが、現在は多くの細胞に発現していることがわかっている



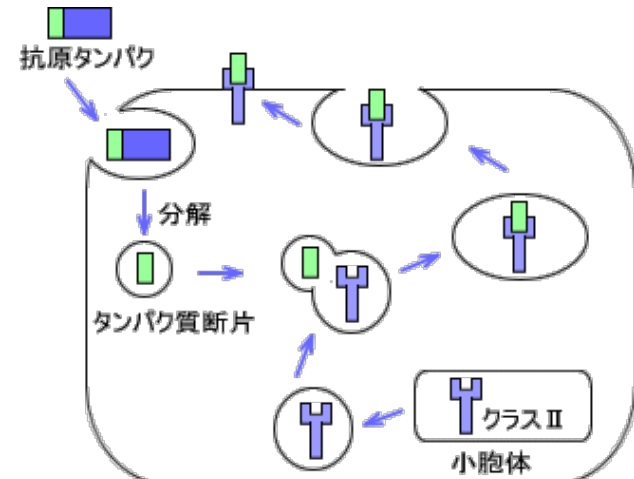
# Class IとClass IIの違い

Class I	項目	Class II
A, B, C	主な抗原(ローカス)	DR, DQ, DP
ほとんどの有核細胞 (血小板等)	発現している細胞	抗原提示細胞
細胞内で合成された タンパク質	抗原として提示するもの	細胞外から入ってきた タンパク質
キラーT細胞	抗原を認識する細胞	ヘルパーT細胞

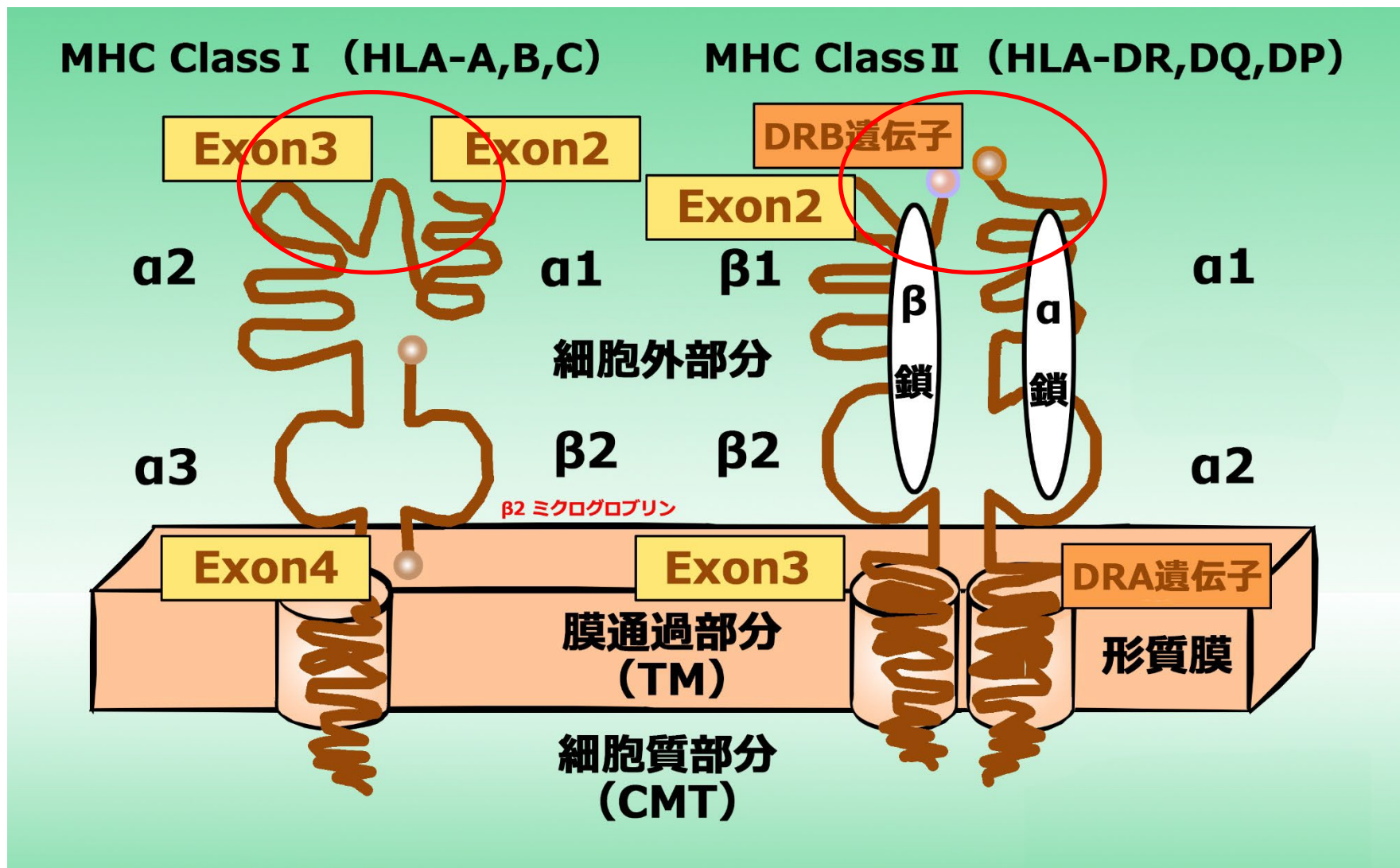
Class I: 内在性のタンパク質(ペプチド)を提示



Class II: 外来性のタンパク質(ペプチド)を提示



# 分子構造



# タイピング領域(Class I)

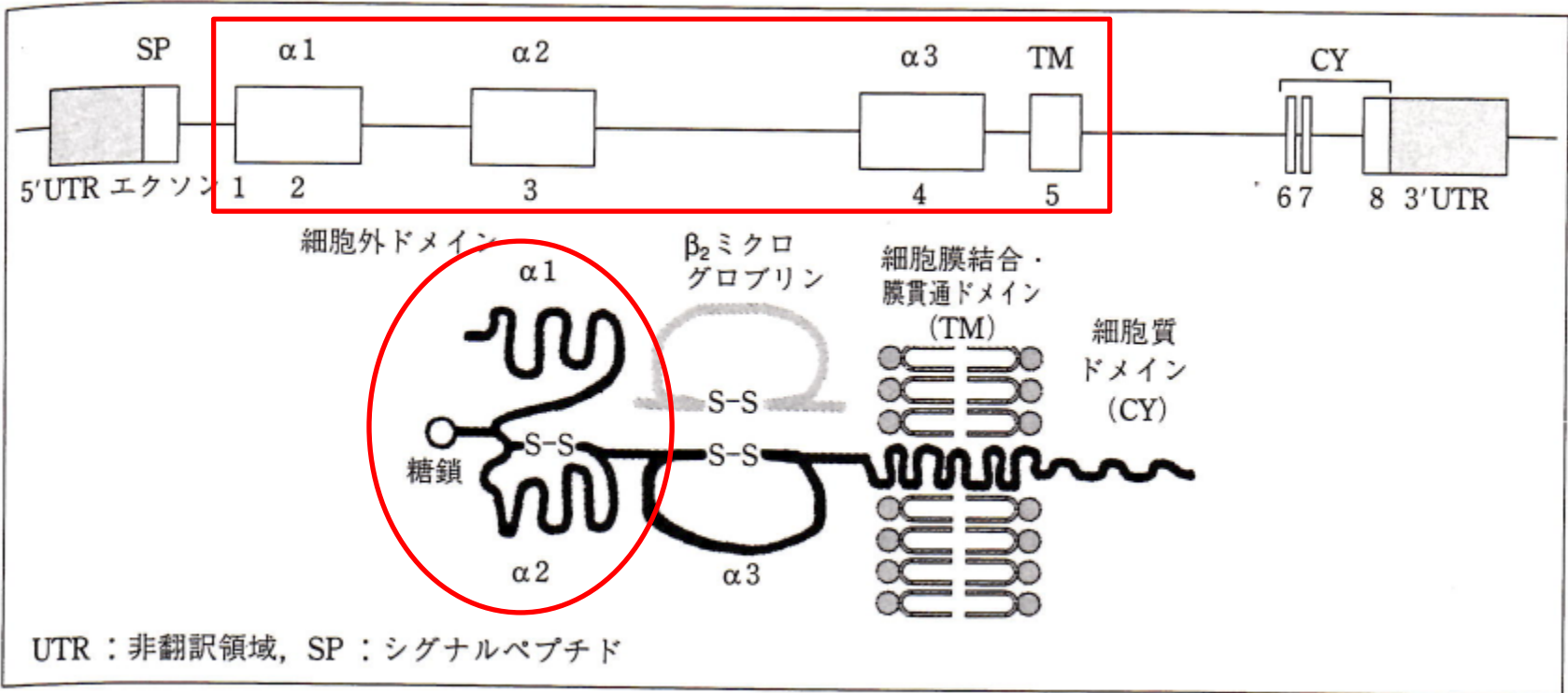
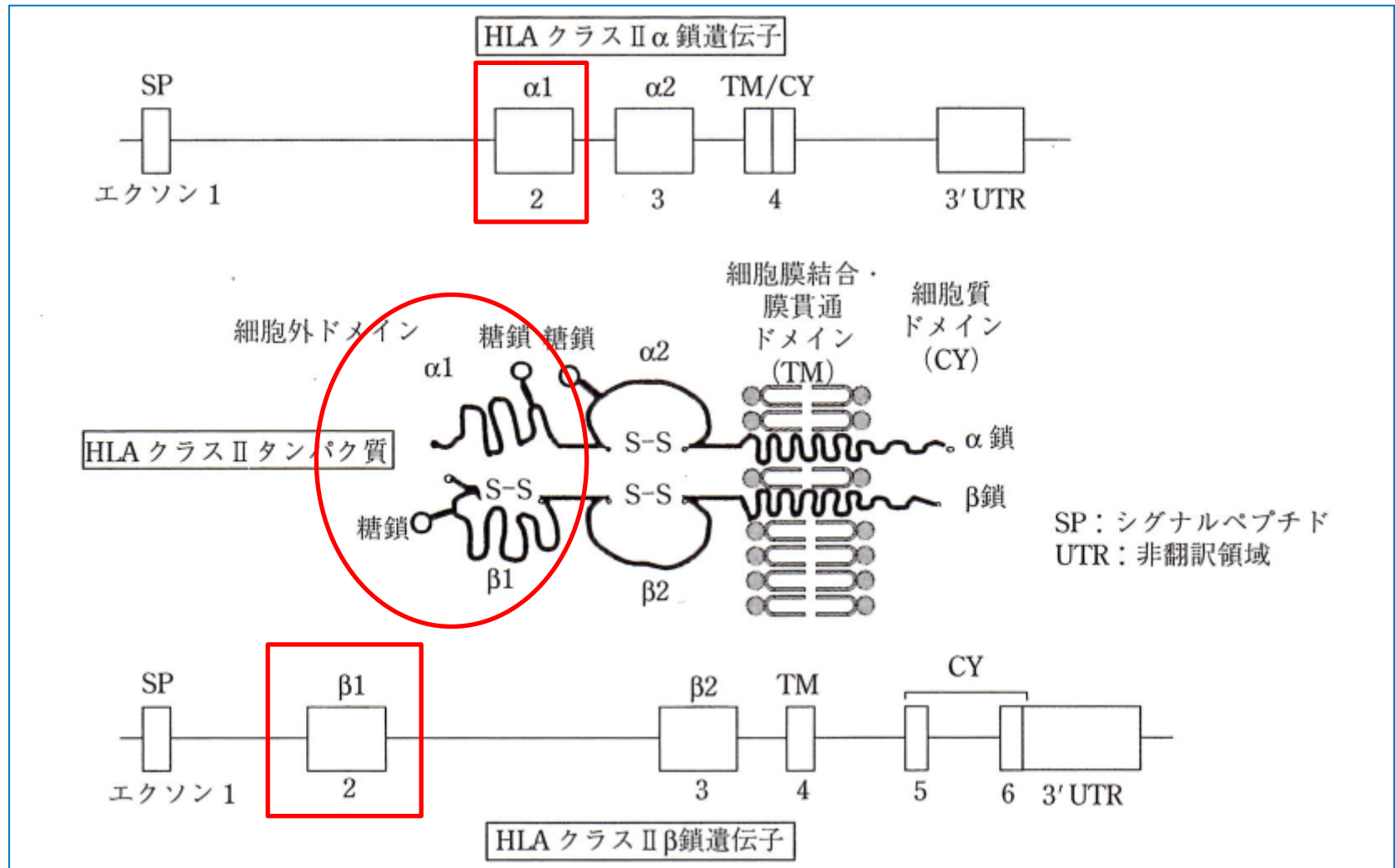


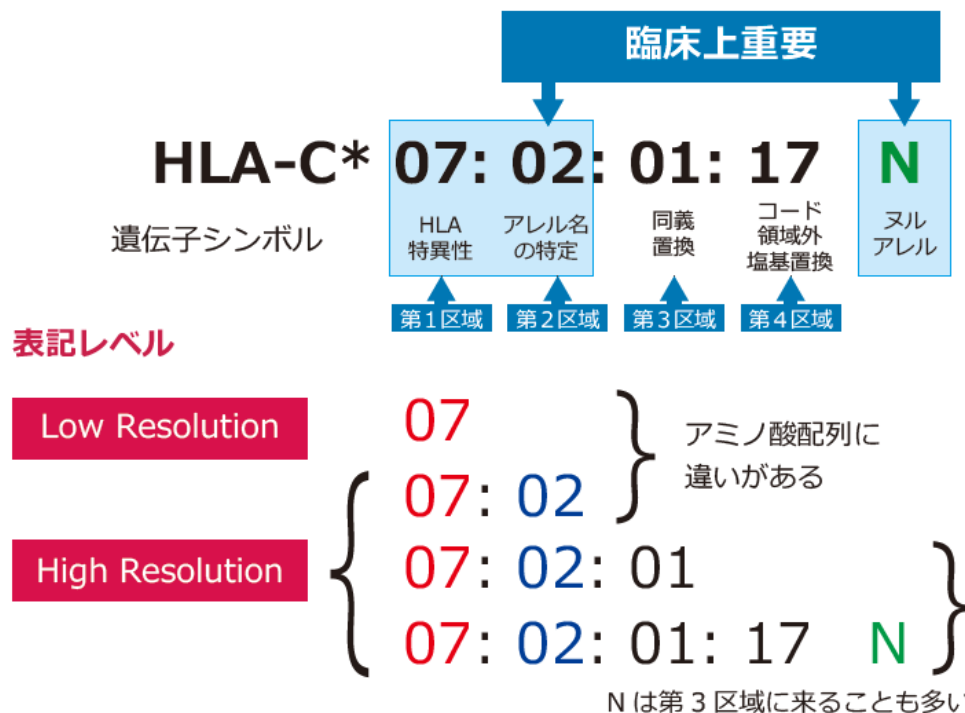
図 2.3 古典的 HLA クラス I 遺伝子構造と分子構造との関連性



# タイピング領域(Class II)



# HLAの表記方法



区域	呼称	表記例
第1区域	2桁、抗原型、血清型、HLA型	Cw7
第2区域	4桁、アレル型、DNA型	HLA-C*07:02
第3区域	6桁	HLA-C*07:02:01
第4区域	8桁	HLA-C*07:02:01:17N

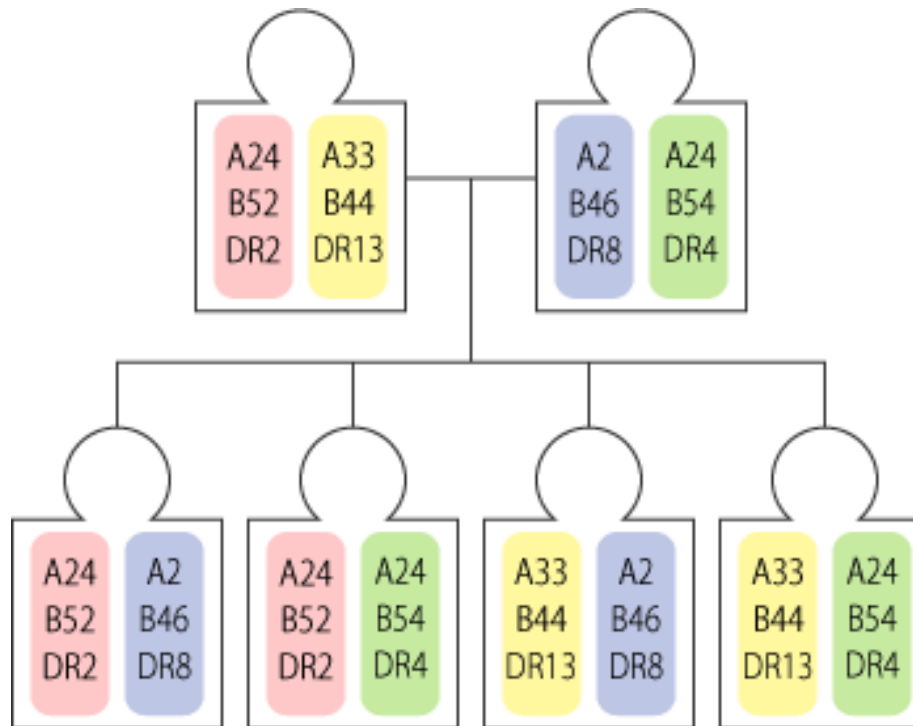
# HLAの特長①人種間差

	Allele	Japanese	African American	European Caucasian
1	A*24:02	36.1	2.5	8.4
2	A*02:01	11.4	11.5	27.5
3	A*02:06	9.2	0.1	0.1
4	A*11:01	9.0	1.4	6.0
5	A*31:01	8.6	1.0	2.7

- 人種により遺伝子頻度は大きく異なる
- HLAは多様性が高い遺伝子
  - 膨大なアレルから頻度を参考に同定している
  - 検体(人種)によってフィルタを変える必要がある

# HLAの特長②ハプロタイプ

- 親より受け継いだHLAの組み合わせがハプロタイプ
- ハプロタイプは維持されたまま親から子に遺伝する
  - 兄弟でHLAが一致する確率は25%

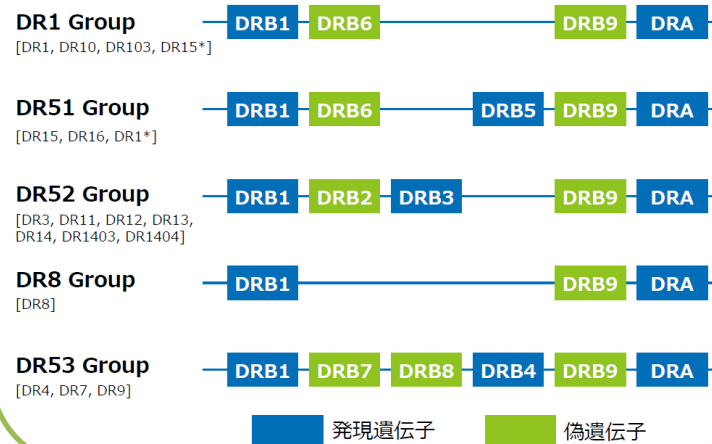


# HLAの特長③連鎖

		DQB1												DRB1				
		DQB1*05:01	DQB1*05:02	DQB1*05:03	DQB1*06:01	DQB1*06:03	DQB1*06:02	DQB1*06:04	DQB1*06:09	DQB1*02:01	DQB1*02:02	DQB1*03:01	DQB1*03:02	DQB1*03:03	DQB1*04:01	DQB1*04:02		
DRB1	DQA1																	
	DRB345	DQA1*01:01	DQA1*01:02	DQA1*01:03	DQA1*01:04	DQA1*01:05	DQA1*01:06	DQA1*01:07	DQA1*01:08	DQA1*01:09	DQA1*01:10	DQA1*01:11	DQA1*01:12	DQA1*01:13	DQA1*01:14	DQA1*01:15		
DRB1*01:01	(Blank)	■															DRB1*01:01	
DRB1*10:01	(Blank)		■														DRB1*10:01	
DRB1*08:02	(Blank)																DRB1*08:02	
DRB1*08:03	(Blank)																DRB1*08:03	
DRB1*15:01	DRB5*01:01			■													DRB1*15:01	
DRB1*15:02	DRB5*01:02				■												DRB1*15:02	
DRB1*16:02	DRB5*02:02		■														DRB1*16:02	
DRB1*13:01	DRB3*01:01																DRB1*13:01	
DRB1*12:01																	DRB1*12:01	
DRB1*14:03																	DRB1*14:03	
DRB1*14:12																	DRB1*14:12	
DRB1*03:01	DRB3*02:02																DRB1*03:01	
DRB1*11:01																	DRB1*11:01	
DRB1*13:07																	DRB1*13:07	
DRB1*14:06																	DRB1*14:06	
DRB1*14:54	DRB3*03:01																DRB1*14:54	
DRB1*14:07																	DRB1*14:07	
DRB1*14:05																	DRB1*14:05	
DRB1*12:02	DRB4*01:02																DRB1*12:02	
DRB1*13:02																	DRB1*13:02	
DRB1*04:01																	DRB1*04:01	
DRB1*04:05																	DRB1*04:05	
DRB1*04:10	DRB4*01:03																DRB1*04:10	
DRB1*04:03																	DRB1*04:03	
DRB1*04:06																	DRB1*04:06	
DRB1*04:07																	DRB1*04:07	
DRB1*07:01																	DRB1*07:01	
DRB1*09:01																DRB1*09:01		

(HLA検査に必要なHLAの基礎知識 中島様講演会資料)

## HLA Class II DR 領域の遺伝子地図



# 動画のご紹介 -HLAとは

- 昨年4月に開催いたしましたWeb講演会で詳しく説明しておりますので是非ご覧ください
  - [https://www.veritastk.co.jp/products/reference\\_detail/suguyakuHLA1\\_1.html](https://www.veritastk.co.jp/products/reference_detail/suguyakuHLA1_1.html)

すぐに役立つHLA【 Vol.1 HLA入門 】  
Part 1 HLAとは



2022年4月27日開催

# LABType試薬とは

# HLAタイピング検査法





# RSSO(Reverse Sequence Specific Oligonucleotide)法

## PCR増幅

- ビオチンで標識したプライマーを使用して目的の遺伝子領域を増幅

## アルカリ変性

- アルカリ性の条件の元で2本鎖を1本鎖にする

## ハイブリダイゼーション

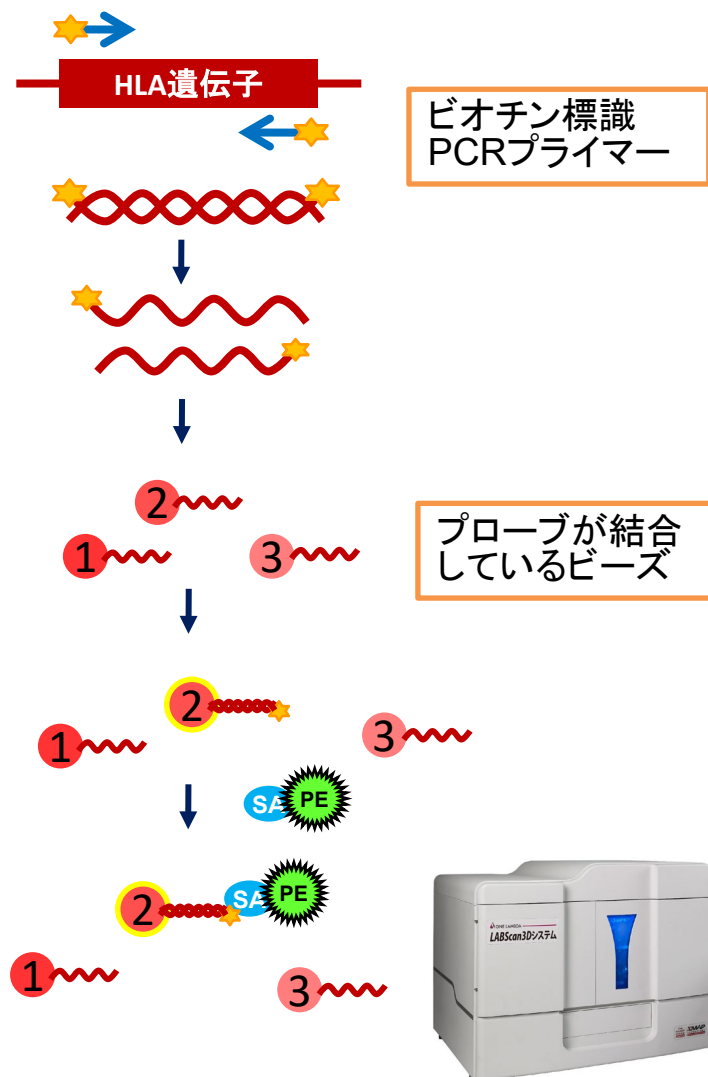
- プローブが結合しているビーズに1本鎖にしたDNAを反応させる

## SAPEでの標識

- ビオチンに蛍光標識をしたストレプトアビジンを結合させる

## 測定

- LABScanシステム/LABScan3Dシステムで測定



# 試薬の種類と解像度

製品群	測定機器	解像度
LABType SSO	LABScanシステムのみ	2桁
LABType CWD	LABScanシステム/LABScan3Dシステム	4桁
LABType XR	LABScanシステム/LABScan3Dシステム	4桁

Locus	プローブ数		
	SSO	CWD	XR
A	83	204	954
B	119	210	1080
C	64	187	1180
DRB1	79	140	416
DQB1	68	-	-
DQA1	34	-	-
DPB1	225	-	-
DPA1	29	-	-

# タイピング領域の比較

ローカス	SSO	CWD	XR
A	Exon2-3	Exon2-5	Exon2-5
B	Exon2-3	Exon2-5	Exon2-5
C	Exon2-3	Exon2-7	Exon2-7
DR	Exon2	Exon2	Exon2
DQ	Exon2	-	-
DP	Exon2	-	-

# 解像度の違い

Pairs Force Type/SubType Match Sero

Group 1: frequent on both alleles

```

A*02:01:01:01 A*24:02:01:01 (G1)
A*02:01:01:01 A*24:20:01:01 (G1)
A*02:07:01:01 A*24:02:01:01 (G1)
A*02:07:01:01 A*24:20:01:01 (G1)
A*02:15N A*24:02:01:01 (G1)
A*02:15N A*24:20:01:01 (G1)
A*02:18 A*24:02:01:01 (G1)
A*02:18 A*24:20:01:01 (G1)
A*02:42:01 A*24:02:01:01 (G1)
A*02:42:01 A*24:20:01:01 (G1)
A*02:53N A*24:02:01:01 (G1)
A*02:53N A*24:20:01:01 (G1)
A*02:59 A*24:02:01:01 (G1)
A*02:59 A*24:20:01:01 (G1)
    
```

Group 2: frequent on one allele

Close Bead Rxn

SSO

Possible Allele Code

```

A*02:XX2 A*24:XX3
A*02:XX1 A*23:113N
XX1=-:02:01:02:07:02:09:02:15N:02:18:02:20:02:24:02:25:02:29:02:30:02:31:02:33:02:42:02:43N:02:53N:02:59:02:60:02:64:02:66:02:67:02:74:02:75:02:82N:02:83N:02:
XX2=-:02:01:02:04:02:07:02:09:02:12:02:15N:02:17:02:18:02:19:02:20:02:24:02:25:02:27:02:29:02:30:02:31:02:33:02:36:02:37:02:42:02:43N:02:53N:02:59:02:60:02:64:
XX3=-:24:02:24:03:24:09N:24:11N:24:13:24:14:24:15:24:20:24:21:24:26:24:27:24:33:24:35:24:36N:24:37:24:39:24:40N:24:43:24:47:24:48N:24:49:24:51:24:53:24:58:24:
    
```

Pairs Force Type/SubType Match Sero

Group 1: frequent on both alleles

```

A*02:01:01:01 A*24:02:01:01 (G1)
    
```

Group 2: frequent on one allele

```

A*02:01:01:01 A*23:113N (G2)
A*02:01:01:01 A*24:02:01:03 (G2)
A*02:01:01:01 A*24:02:01:04 (G2)
    
```

Close Bead Rxn

CWD

Possible Allele Code

```

A*02:XX2 A*24:XX3
A*02:XX1 A*23:113N
XX1=-:02:01:02:20:02:31:02:43N:02:67:02:74:02:75:02:83N:02:93:02:95:02:97:02:101:02:105:02:121:02:132:02:133:02:134:02:140:02:151:02:161:02:164:02:177:02:181:
XX2=-:02:01:02:20:02:31:02:42:02:43N:02:59:02:67:02:74:02:75:02:83N:02:93:02:95:02:97:02:101:02:105:02:121:02:132:02:133:02:134:02:140:02:150:02:151:02:161:02:
XX3=-:24:02:24:21:24:36N:24:48N:24:49:24:79:24:83N:24:86N:24:90:24:93:24:106:24:116:24:120:24:122:24:128:24:132N:24:135:24:136:24:142:24:143:24:148:24:152:24:
    
```

Pairs Force Type/SubType Match Sero

Local Demographic Data [ver1\_Japanese ^

Group 1: frequent on both alleles

```

A*02:01:01:01 A*24:02:01:01 (G1)
    
```

Group 2: frequent on one allele

```

A*02:01:01:01 A*24:02:01:03 (G2)
A*02:01:01:01 A*24:02:01:04 (G2)
    
```

Close Bead Rxn

XR

Possible Allele Code

```

A*02:XX1 A*24:XX2
XX1=-:02:01:02:42:02:296 02:314:02:570:02:642:02:704:02:706:02:707:02:716:02:719:02:720:02:722:02:724:02:726:02:729:02:730:02:733:02:735:02:739:02:740:02:74
XX2=-:24:02:24:353:24:38 24:388N:24:389N:24:391:24:393:24:396N:24:398:24:400:24:401:24:402:24:416:24:417:24:418:24:419:24:422:24:423:24:426N:24:428N:24:
    
```

# LABType製品一覧

2桁タイピング

SSO,CWD,XRの3種類がある  
DQとDPはα鎖とβ鎖を同時にタイピング可能

商品名	商品コード	梱包単位	商品コード	梱包単位
LABType SSO HLA A Locus	RSSO1A	100 tests	RSO1AT	20 tests
LABType SSO HLA B Locus	RSSO1B	100 tests	RSO1BT	20 tests
LABType SSO HLA C Locus	RSSO1C	100 tests	RSO1CT	20 tests
LABType SSO HLA DRB1	RSSO2B1	100 tests	RSO2B1T	20 tests
LABType SSO HLA DRB3,4,5	RSSO2345	100 tests	RSO2345T	20 tests
LABType SSO HLA DQA1/DQB1	RSSO2Q	100 tests	RSO2QT	20 tests
LABType SSO HLA DPA1/DPB1	RSSO2P	100 tests	RSO2PT	20 tests

商品名	商品コード	梱包単位	商品コード	梱包単位
LABType CWD Class I A Locus	RSSOW1A	100 test	RSOW1AT	20 test
LABType CWD Class I B Locus	RSSOW1B	100 test	RSOW1BT	20 test
LABType CWD Class I C Locus	RSSOW1C	100 test	RSOW1CT	20 test
LABType CWD Class II DRB1 Locus	RSSOW2B1	100 test	RSOW2B1T	20 test

商品名	商品コード	梱包単位	商品コード	梱包単位
LABType XR Class I A Locus	RSSOX1A	100 test	RSOX1AT	20 test
LABType XR Class I B Locus	RSSOX1B	100 test	RSOX1BT	20 test
LABType XR Class I C Locus	RSSOX1C	100 test	RSOX1CT	20 test
LABType XR Class II DRB1 Locus	RSSOX2B1	100 test	RSOX2B1T	20 test

4桁タイピング

LABScan3Dシステム専用試薬

# LABTypeキット内容

	試薬名	注意点
PCR前	Locus-Specific Primer Set	冷凍(-20°C以下)
	Primer Set D-mix	冷凍(-20°C以下)、紫色の液体
PCR後	Bead Mixture	解凍後3か月以内に使用 開封後は冷蔵・遮光、再凍結禁止
	Denaturation Buffer	25°C以下で保存 NaOHのため取り扱い注意
	Neutralization Buffer	25°C以下で保存、紫のキャップ
	Hybridization Buffer	25°C以下で保存
	Wash Buffer	25°C以下で保存
	SAPE Buffer	冷蔵(2-8°C)保存

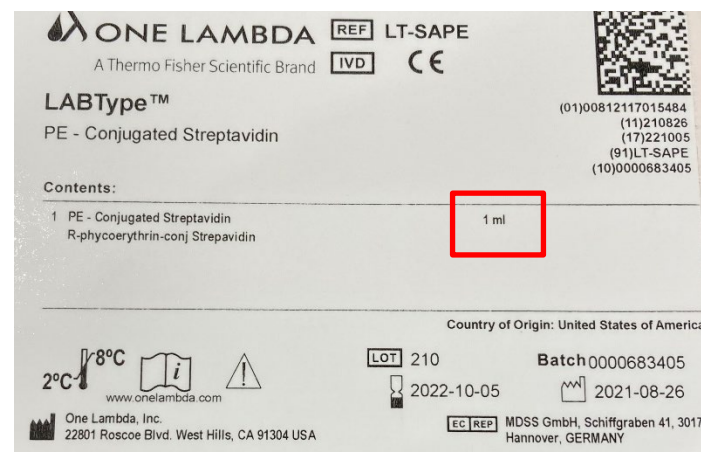


- Primer setとBeads Mixtureはローカスごとに異なる
- その他の試薬は全てのLABTypeキットで共通

# キット以外に必要な試薬

種類	商品名	メーカー
SAPE (標識試薬)	PE-Conjugated Streptavidin	ベリタス(One Lambda)LT-SAPE 精製水で溶解、冷蔵で6か月保存
PCRポリメラーゼ	AmpliTaq DNA Polymerase Goldは不可	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) N8080160

- SAPEはLABTypeキットに含まれない(別売)
  - 粉末の試薬のため事前にラベルに記載されている容量の精製水で溶解
  - 溶解後は冷蔵で6か月保存可能

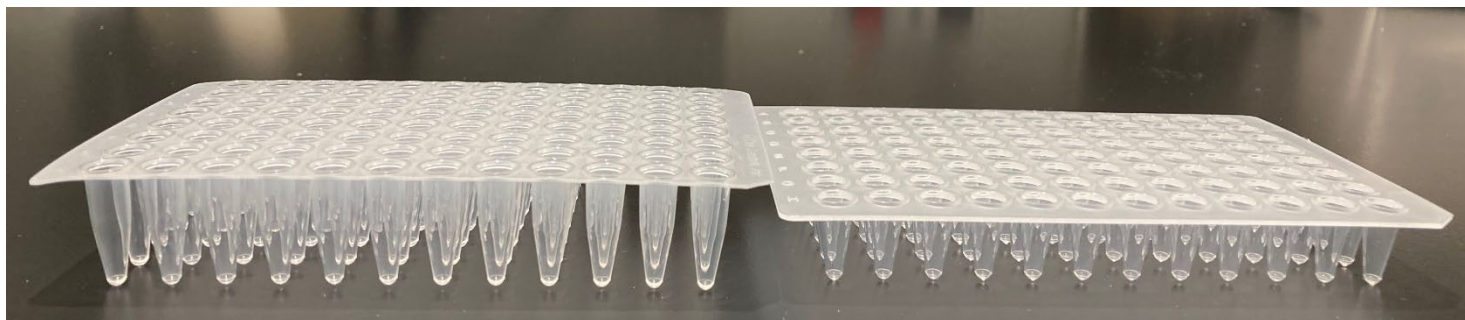


# キット以外に必要な消耗品

種類	商品名	メーカー
プレート	PCRプレート(PCR用)	Thermo Fisher Scientific AB0600
	PCRプレート(ロープロファイル、測定用)	Thermo Fisher Scientific AB0700
PCRシール	Adhesive Sealing Sheet	Thermo Fisher Scientific AB0558
	SSP Tray Seals (ハイブリ用)	ベリタス (One Lambda) SSPSEA300/同等品でも可

PCR用(AB0600)

測定用(AB0700)



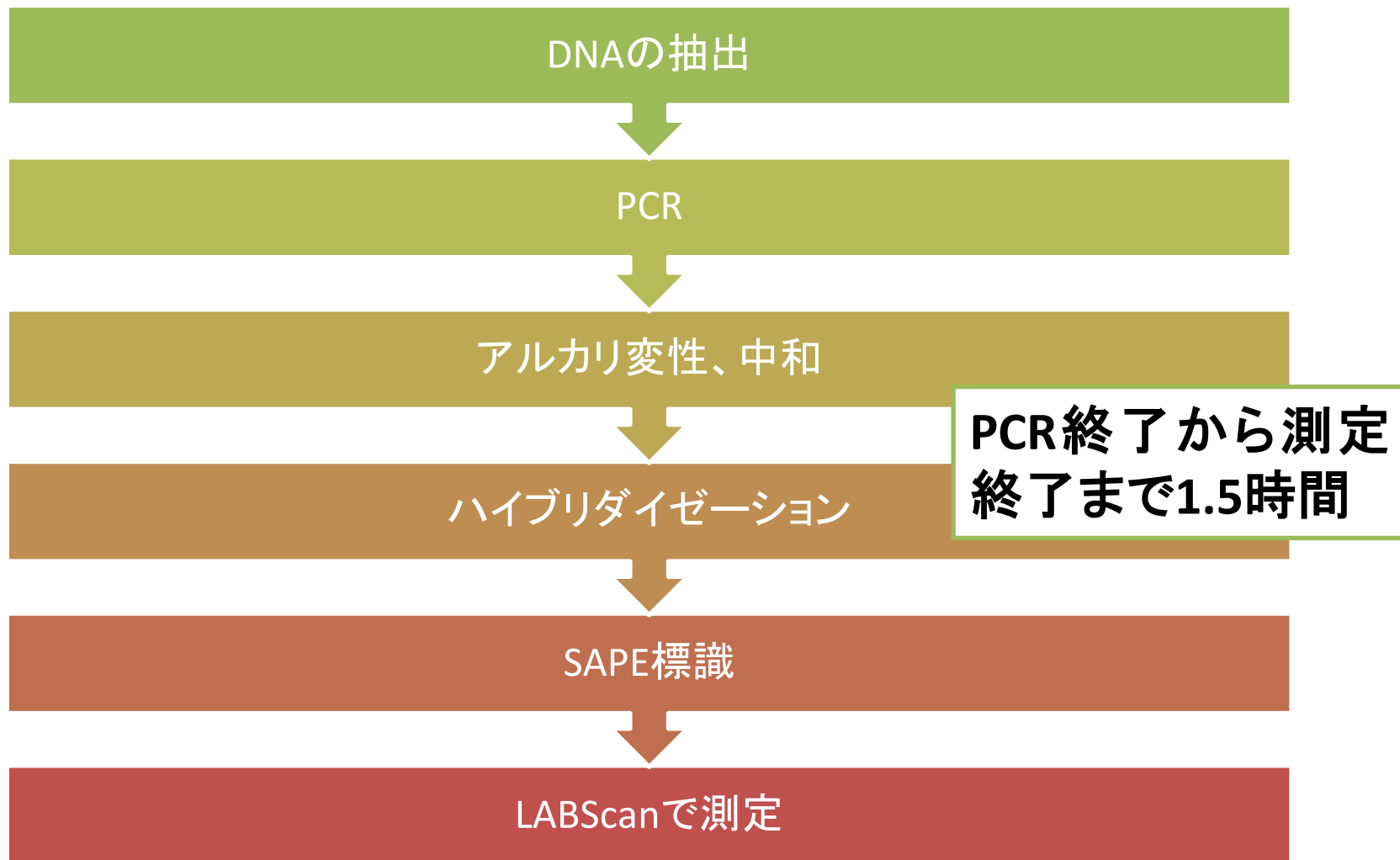


# キット以外に必要な器具

種類	商品名	メーカー
サーマルサイクラー	GeneAmp PCR System 9700シリーズ(アルミヘッドは不可) Veriti 96-Well サーマルサイクラー	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)
PCRパッド	マイクロSSP PCR用パッド PE9700用	ベリタス (One Lambda) SSPPADTN
遠心機	プレート遠心機	96Wellプレートを1300g以上で遠心ができる機器/メーカー不問
測定機器	LABScanシステム/LABScan3Dシステム	ベリタス (One Lambda)

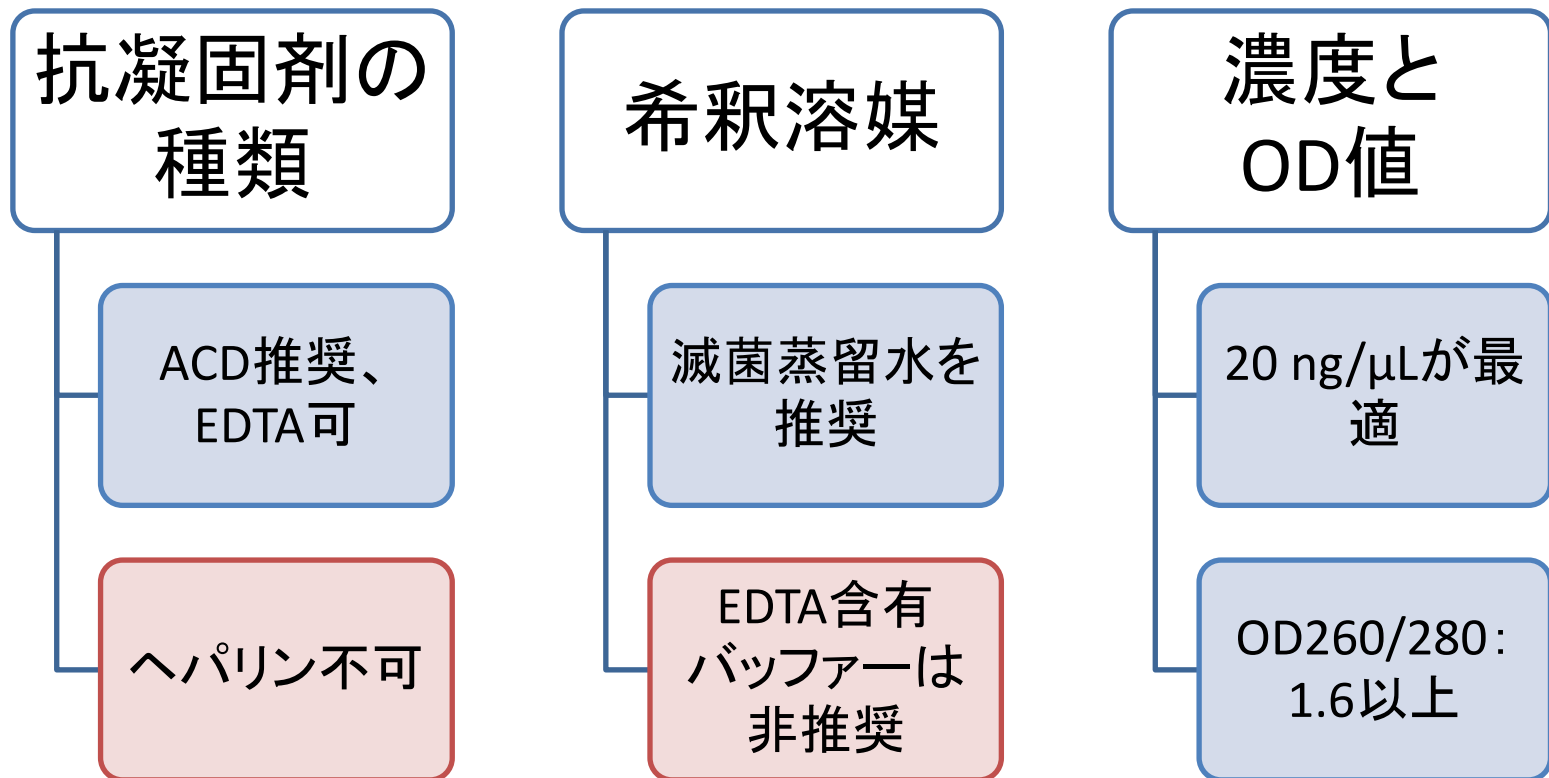
# 手技のポイント

# LABTypeの操作の流れ



# DNAの抽出

- PCRに適した品質、濃度のDNAを抽出
- PCRを阻害する成分の混入を避ける

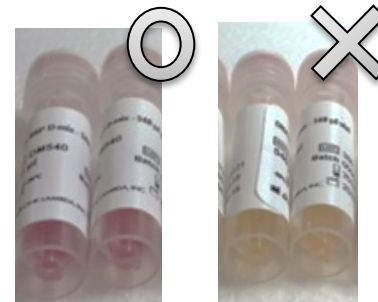


# PCR試薬の調整

- DNA検体、D-mix、Primer mixを解凍
- プレミックス液の容量(ローカス毎に調整)

Primer mix	4.0 $\mu\text{L}$
D-mix	13.8 $\mu\text{L}$
Ampli Taq	0.2 $\mu\text{L}$
合計(/1Well)	20.0 $\mu\text{L}$

黄色になったD-mixは使用不可



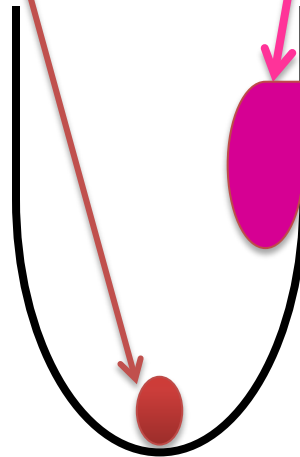
- D-mix、プライマーはよくボルテックス
- Ampli Taqは使用直前に冷凍庫から取り出し、ピペティングでよく混ぜる(ボルテックス不可)
- 検体数が少ない場合は、D-mixとTaqのみを先に混合する

# 検体とプレミックス液の分注

(1) DNA 2.0  $\mu\text{L}$ をPCRトレイの底部に分注

(2) プレミックス液 18  $\mu\text{L}$ を分注

- D-mix (13.8  $\mu\text{L}$ )
- Primer mix(4  $\mu\text{L}$ )
- Ampli Taq (0.2  $\mu\text{L}$ )



- PCRトレイはAB0600(Thermo Fisher Scientific社製)を使用する
- PCRシールはAB0558 (Thermo Fisher Scientific社製)を使用する
- プレミックス液は氷上で分注する
- プレミックス液を分注した後はできるだけ速やかにサーマルサイクラーへ入れる

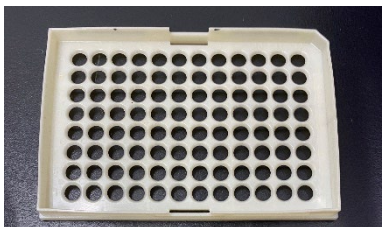
# PCR (約85分)

- プラスチックトレイ、パッドで蒸発防止
- 9600モードを使用
- ホットスタートを推奨

試薬がウェルの底にあることを確認



パッド&トレイで蒸発防止

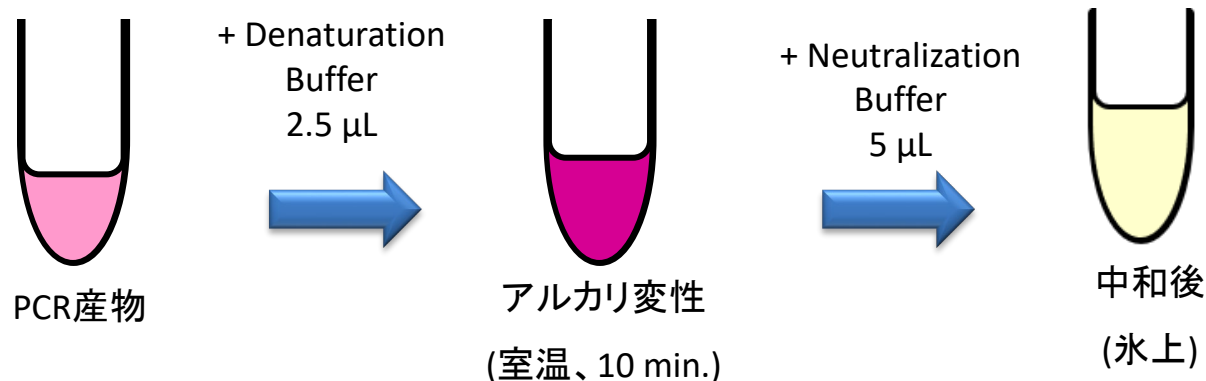


PCR条件 (Reaction volumeは20  $\mu$ L)

温度	時間	サイクル数
96°C	3 min	1 cycle
96°C	20 sec	5 cycles
60°C	20 sec	30 cycles
72°C	20 sec	
96°C	10 sec	
60°C	15 sec	1 cycle
72°C	20 sec	
72°C	10 min	
4°C	Forever	

# アルカリ変性、中和

- PCRトレイはAB0700(Thermo Fisher Scientific社製)を使用する
- PCR産物をサーマルサイクラーから取り出した際に、サーマルサイクラーを60°Cに設定する
- PCRチューブの底にDenaturation Buffer 2.5  $\mu$ Lを分注しスピンドウン
- PCR産物 5  $\mu$ Lを8連ピペットで分注し、ピペッティングで混合
  - 溶液が濃いピンクに変色することを確認
- 10分間室温で置く。反応の間にビーズ試薬を調整(次スライド)
- 10分後、Neutralization Bufferを5  $\mu$ L加えピペッティングでしっかり混合
  - 溶液が透明に変色することを確認





# Beads試薬の調整

- アルカリ変性の反応中に調整
- Bead Mixtureは、ボルテックス後にスピンドウンし、しっかりとピペッティングで混合
- Beads試薬はローカス毎に調整

Bead Mixture	4.0 $\mu\text{L}$
Hybridization Buffer	34.0 $\mu\text{L}$
合計(/1Well)	38.0 $\mu\text{L}$

- 調整後は氷上に置く

# ハイブリダイゼーション

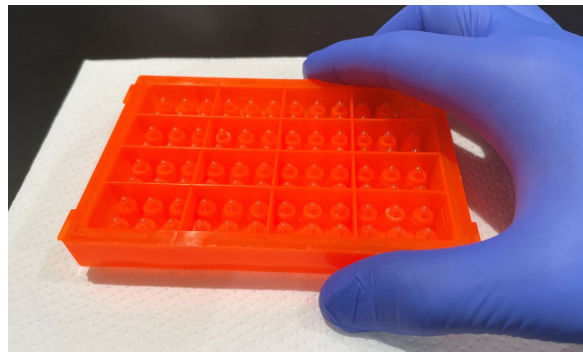
- 中和後のトレイを氷上に置き、氷上で分注する
- Beads試薬を38.0  $\mu\text{L}$ ずつ分注する
  - ローカス毎に試薬は異なるので、分注間違いに注意
  - できるだけ速やかに分注
- 分注後、シールを貼り速やかにサーマルサイクラーへ入れる
- サーマルサイクラーで60°C、15分間反応
- 反応後は速やかに氷上に置く

# 洗浄操作(3回繰り返す)

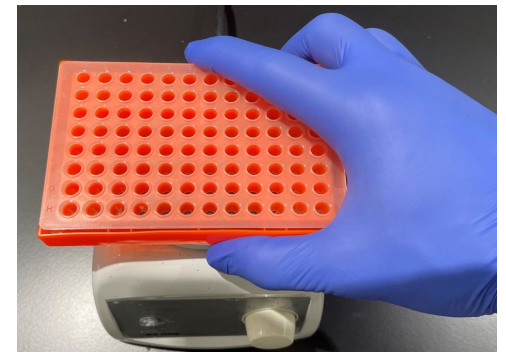
- Wash Bufferを100  $\mu$ L(1回目のみ70  $\mu$ L、氷上で行う)添加し、シールを貼る
- 1500g、3分間(1300g、5分間でも可)遠心
- フリッキングにより上清を除去
- キムタオルの上で軽く3回程度タッピングする
- ビーズのみの状態でボルテックス(ドライボルテックス)



フリッキング



タッピング



ドライボルテックス

# SAPE標識

- 3回目の洗浄時に調整、調整後は遮光保存
  - 2～3検体分多めに調整することを推奨
  - 全ローカス共通

SAPE溶液	0.5 $\mu$ L
SAPE Buffer	49.5 $\mu$ L
合計(/1well)	50.0 $\mu$ L

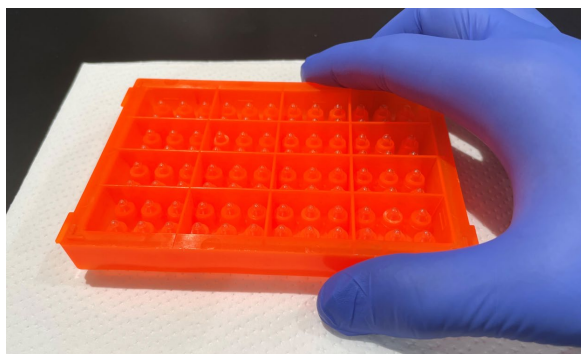
- SAPE溶液はLABTypeキットに含まれていない
  - 事前に精製水で溶解
  - 溶解後は冷蔵で6か月保存可能
- 50.0  $\mu$ Lずつ分注し、シールを貼りサーマルサイクラーで60 $^{\circ}$ C、5分間反応

# 洗浄操作

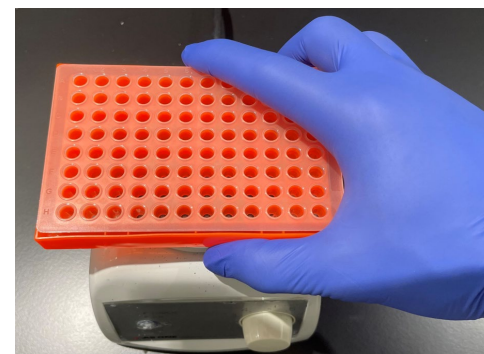
- Wash Bufferを70  $\mu$ L添加し、シールを貼る
- 1500g、3分間(1300g、5分間でも可)遠心
- フリッキングにより上清を除去
- キムタオルの上で軽く3回程度タッピングする
- ビーズのみの状態でボルテックス(ドライボルテックス)



フリッキング



タッピング



ドライボルテックス

# LABScanで測定

- 洗浄後、Wash Bufferを70  $\mu$ L加え測定
- 測定用のテンプレートファイルはローカス毎に異なるため注意
  - テンプレートファイルはベリタスのWebよりダウンロード可能
  - [https://www.veritastk.co.jp/hla/soft\\_file.html](https://www.veritastk.co.jp/hla/soft_file.html)
- 調製後のサンプルはシールを貼り冷蔵&遮光で24時間保存可能
  - 測定前によくピペティングで混合してから測定する

