



KIR SSOによるタイピング

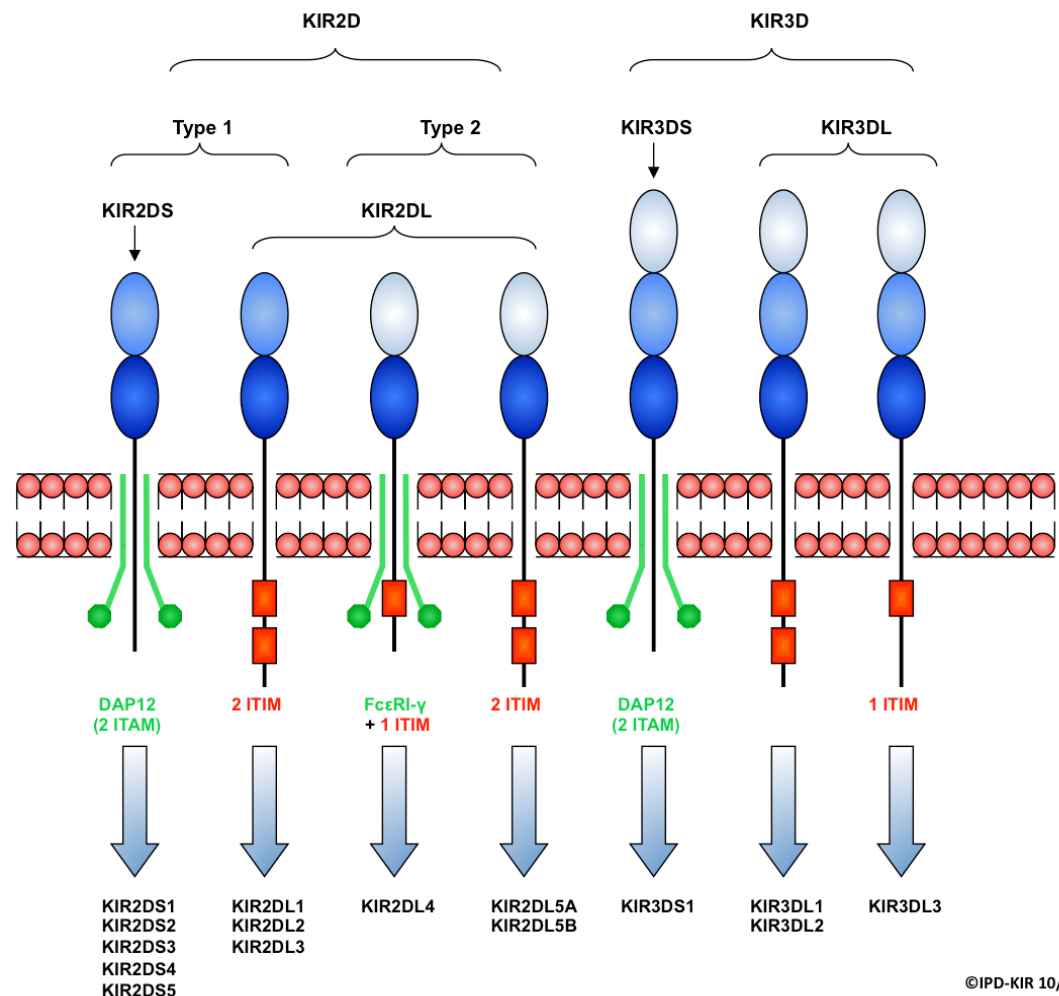
株式会社ベリタス
技術推進部

目次

- KIRとは
- KIR SSOの原理
- 測定機器：LABScan100
- LABType[®]製品説明
- LABType[®]キット内容
- 操作手順
- ケーススタディ
- トラブルシューティング

KIRとは？

- 免疫グロブリン様受容体 (Killer cell Immunoglobulin-like Receptor)
 - NK細胞上に発現しており、MHCクラスI分子を認識して、NK細胞の細胞傷害活性を抑制します。
- KIRには多型が存在
 - 細胞外ドメインを2個持っているものを2D、3個持っているものを3Dと名づけられています。
 - 細胞内ドメインの長によってLong (L)、Short (S)とそれぞれ分けられます。
 - 活性化型と抑制型があります。



KIRと各リガンド

KIR	機能	KIRリガンド
2DL1	抑制型	HLA-C (C2)
2DL2	抑制型	HLA-C (C1)
2DL3	抑制型	HLA-C (C1)
2DL4	活性型	HLA-G?
2DL5	?	?
3DL1	抑制型	Bw4,一部のHLA-A
3DL2	抑制型	HLA-A3,A11
3DL3	?	?
2DS1	活性型	HLA-C (C2)
2DS2	活性型	HLA-C (C1)
2DS3	活性型	HLA-C (C2)
2DS4	活性型	一部のHLA-Cw4,A11
2DS5	活性型	?
3DS1	活性型	?

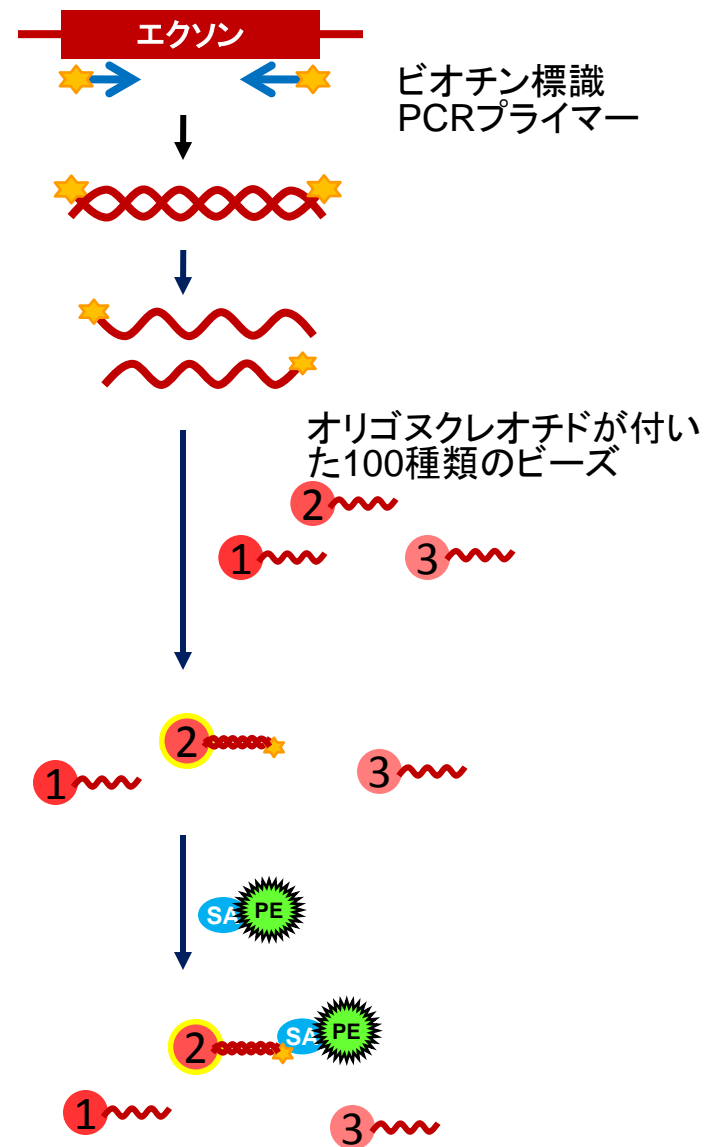
KIRとHLAの対応表

HLA-A		HLA-B※		HLA-C	
A3,A11	Bw4	Bw4	C1	C1	C2
3DL2	3DL1	3DL1	2DL2&L3,2DS2	2DL2&L3,2DS2	2DL1,2DS1&S3
A3	A24※	B5	B46	Cw1	Cw2
A11	A32	B27※		Cw7	Cw4
		B37		Cw8	Cw5
		B38		Cw9	Cw6
		B44		Cw10	Cw15
		B49		Cw12	Cw17
		B51		Cw14	
		B52		Cw16	
		B53			
		B57			
		B58			
		B59			
		B77			

※A*24:04,B*13:01,B*13:02,B*27:08は含まない

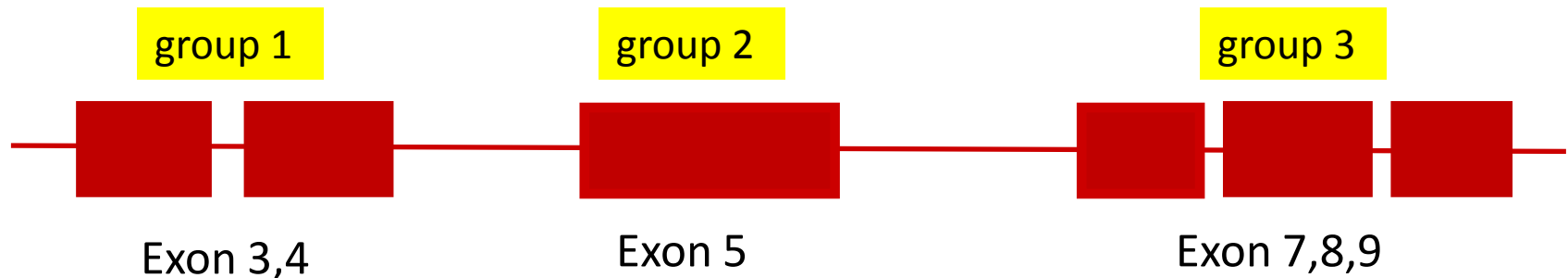
KIR SSOの原理

- PCR-rSSO法を利用
 - ① PCR増幅: ビオチン標識プライマーで特定遺伝子領域を増幅させる
 - ② アルカリ変性: 二重螺旋構造のPCR産物を変性させ、一本鎖にする
 - ③ ハイブリダイゼーション: 一本鎖のPCR産物と特異的な配列のオリゴヌクレオチドを結合させる
 - ④ 標識(ラベリング): ハイブリダイゼーションしたビーズをPEストレプトアビジンにより標識する
 - ⑤ LABSCan100による測定: 各ビーズの蛍光強度の測定



KIR SSOのプライマーの遺伝子増幅領域

- Primerは3種類 (group 1 , group 2 , group 3)



- Low Resolution タイピングには、
Exon3,4,5,7,8,9がターゲットが必要です。*

*Crum KA, Logue SE, Curran MD, Middleton D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. Tissue Antigens. 2000 Oct; 56(4):313-26.

KIR SSOで測定可能なKIR遺伝子

各ローカスの有無を測定します。

2DL1	2DS1	3DL1
2DL2	2DS2	3DL2
2DL3	2DS3	3DL3
2DL4	2DS4*	3DS1
2DL5*	2DS5	2DP1**
		3DP1**

*Plus null alleles


**Pseudogenes

LABType[®]キット内容



使用段階	試薬名	注意点
PCR前 [PRE PCR]	Primer Mix (Group1-3)	冷凍(−20℃保存)
	D-Mix	冷凍(−20℃保存)、紫色
PCR後 [POST PCR]	Beads Mix (Group1-3)	開封後は冷蔵・遮光保存 再凍結厳禁! 解凍後3か月以内に使用
	変性Buffer	常温保存。強アルカリ性、取扱い注意
	中和Buffer(紫キャップ)	常温保存
	ハイブリBuffer(緑label)	常温保存
	洗浄Buffer	常温保存
	SAPE Buffer(橙label)	冷蔵(2−8℃)保存

KIR SSOキット以外に必要な試薬

製品名	メーカー	型番	備考
PE-Conjugated Streptavidin	One Lambda/ ベリタス	LT-SAPE	<ul style="list-style-type: none">✓ 2000検体分✓ プローブの蛍光標識✓ 滅菌水で希釈後は、遮光で冷蔵保存
Ampli <i>Taq</i> DNA polymerase 	ABI/ Life Technologies	N8080160	<ul style="list-style-type: none">✓ メーカー指定✓ Ampli<i>Taq</i> “Gold” は使用不可✓ 他社製品の<i>Taq</i> DNA polymeraseも不可

KIR SSO実験に必要な機器



製品名	メーカー	型番	備考
サーマルサイクラー GeneAmp PCR 9700 /又は veriti	ABI/ Life Technologies		参考商品 アルミヘッド不可
高速遠心機 (1300 xg、96プレート用)	KUBOTA	5420	参考商品
ボルテックスミキサー			メーカー問わず
LABScan100 (Luminex)	One Lambda/ ベリタス	LABSCNXN	

KIR SSOの操作の流れ

①PCR (約1~1.5 時間)



②アルカリ変性、中和(約15分)



③ハイブリダイゼーション(15分)



洗浄 × 3 (10 - 15分)

④標識(ラベリング)(10分)



洗浄 × 1 (5分)

⑤LABScan 100 またはLuminexで蛍光強度測定

結果が出るまで:
約2.5 - 3時間

PCR溶液調整の注意点

- 調製前にD-Mixはよくボルテックス
- 黄色に変色したD-Mixは酸化しているので、使用不可（通常はピンク色でアルカリ性）
- *Taq* ポリメラーゼは、**Ampli*Taq*** (ABI / Life Technologies)を使用。他の*Taq*は使用不可
- D-Mix、*Taq* ポリメラーゼを入れた際によくピペッティングする
- 蒸発を防ぐために確実にシール（またはキャップ）をする

使用するDNAの条件

- ACD加血由来のDNA推奨 (EDTAも可)
- ヘパリン加血は不可
(PCRの反応を阻害する危険性があるため)
- DNAは以下の範囲内である事を確認
 - DNA濃度: 20~60ng/ μ Lが最適
 - DNA純度: $A_{260}/A_{280} = 1.65$ 以上
 - DNA溶液は滅菌水で溶解

①PCR溶液調整

- DNA検体、D-mix、Primer mixを解凍し、使用するまで氷上に置いておく。
- プレミックス調整後は、なるべく早くPCRを開始させる。

各DNA溶液 (20 ng/ μ L)	2.0 μ L	プレミックス溶液
各ローカスのPrimer mix	4.0 μ L	
D-mix	13.8 μ L	
Ampli <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.2 μ L	
<hr/>		
Total (1テストあたり)	20.0 μ L	

調整量は、サンプル数 + 1,2検体余分に調整して下さい。

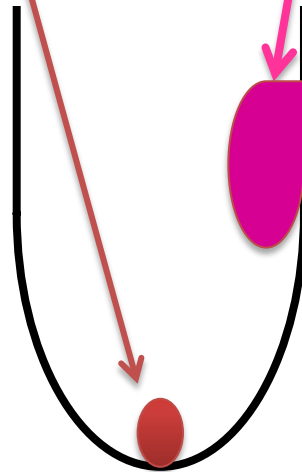
プレミックス分注方法

(1) DNA溶液 2.0 μL
チューブの底部に
分注、による確認

(2) プレミックス溶液 18 μL

- D-mix (13.8 μL)
- Primer mix (4 μL)
- Taq DNA
Polymerase (0.2 μL)

各プライマーで
プレミックス溶液を使用



プレート作成例(32検体以下の場合)

→ Group 1,2,3

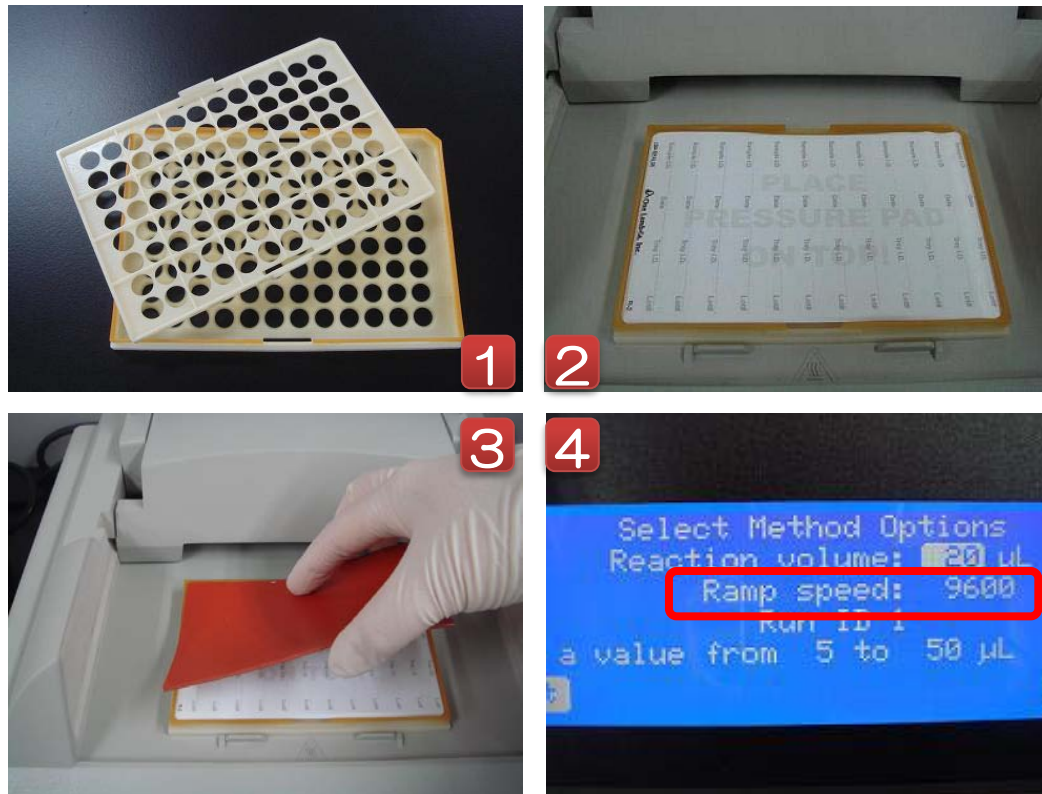
→ DNA 1,2,3,4,...

DNA 1 Group 1	DNA 1 Group 2	DNA 1 Group 3	
DNA 2 Group 1	DNA 2 Group 2	DNA 2 Group 3	
DNA 3 Group 1	DNA 3 Group 2	DNA 3 Group 3	
DNA 4 Group 1	DNA 4 Group 2	DNA 4 Group 3	
...	

32検体以上の場合、1プレートに1group作成します。

サーマルサイクラーへセット

- プラスチックトレイを敷き、96ウェルプレートの上部にPCR用パッドをのせる(8連チューブの場合不要)
- ホットスタート(90°C以上)をお勧めします。



PCR条件

時間： 約1～1時間半

ステップ	温度・時間	サイクル数
ステップ 1	96°C、3 min.	1
ステップ 2	96°C、20 sec.	5
	60°C、20 sec.	
	72°C、20 sec.	
ステップ 3	96°C、10 sec.	30
	60°C、15 sec.	
	72°C、20 sec.	
ステップ 4	72°C、10 min.	1
ステップ 5	4°C、Forever	1

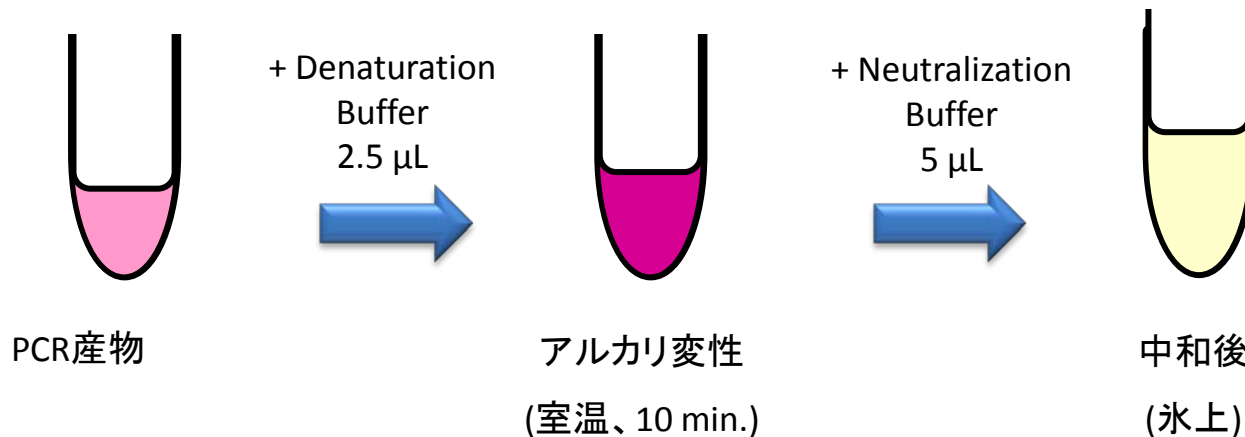
PCR後の準備

- LABScan 100の電源をON
- サーマルサイクラーをON
 - 60°C、Forever



②アルカリ変性 ～ 中和

- ① PCRチューブの底に変性Buffer2.5ulを予め分注、スピンドウン。
バッファーはリザーバーに入れ、8連ピペットで分注すると楽です。
- ② PCR産物を5ulを①のチューブに8連ピペットで分注、ピペッティング
- ③ 室温で、10分間反応。この間に各ビーズミックスを調整(次スライド)
- ④ 10分後、中和Bufferを5ul加え、溶液が透明になる事を確認します。
バッファーはリザーバーに入れ、8連ピペットで分注すると楽です。



各Beads mix溶液の調整

- アルカリ変性中に調整
- 各Beads mixは使用する前にスピンドウン、しっかりとボルテックス、ピペッティングしてから取り出します。
- Beads mixはグループ毎に作成します。
 - 検体数+1~2検体分多めに作成

各Beads mix	4.0 μ L
------------	-------------

Hybridization Buffer	34.0 μ L
----------------------	--------------

total (1テストあたり)	38.0 μ L
-----------------	--------------

Beads mix溶液分注時の注意

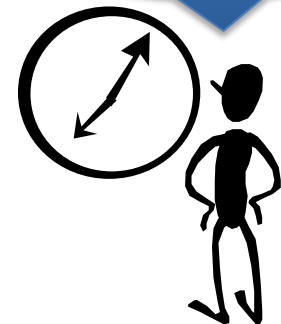
- 氷上で分注する
- グループ毎にBeads mixは異なるので、試薬の入れ間違いに注意する
- ウェル間のコンタミを防ぐため、しっかりとシールを貼る。

③ハイブリダイゼーション

- サーマルサイクラーは予め60°Cに設定
- 60°C、15分間



60°C,
15 minutes

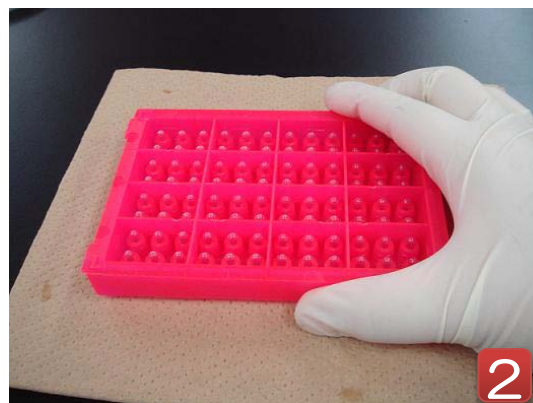


洗浄操作の準備

- ハイブリダイゼーション後の一回目の洗いは特に重要です。
- Wash Bufferをリザーバーへ入れ、8連ピペット、氷を準備しておきます。
- ハイブリ後は、反応をとめるために、プレートをすぐに氷冷します。

洗浄操作(3回繰り返す)

- ① Washing bufferを100ul添加し、シールを貼る
- ② 2000 × g、2分間、または1500 × g、3分間で遠心
- ③ フリッキングにより上清を除去
- ④ キムタオルで5秒間押しつけ、軽く5回タッピングする
- ⑤ ビーズのみの状態でボルテックス(ドライボルテックス)



標識(ラベリング)の準備



- 3回目の洗浄時に調整
- 調整後は、しっかりボルテックス

SAPE 濃縮溶液	0.5 μ L
-----------	-------------

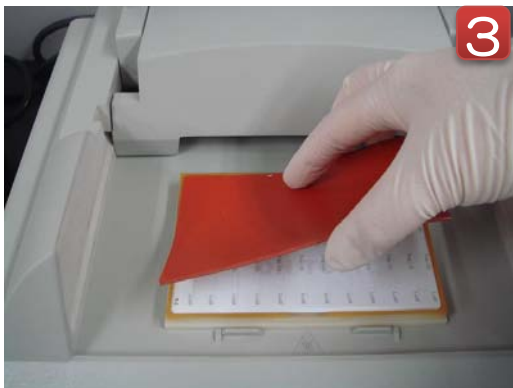
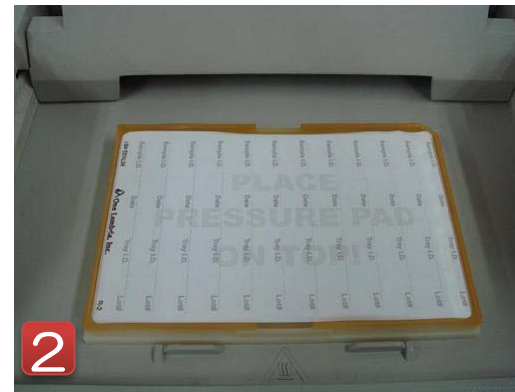
SAPE Buffer	49.5 μ L
-------------	--------------

total (1テストあたり)	50.0 μ L
-----------------	--------------

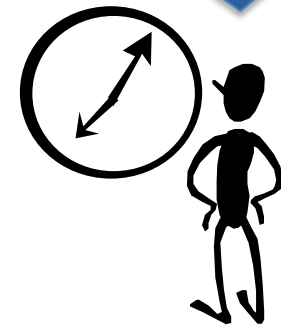
※ 検体数 + 2-3検体分余裕をもって作成します。全検体共通です。

④ 標識 (ラベリング)

- サーマルサイクラーは予め60°Cに設定
- 60°C、正確に5分間(蛍光物質の退色を防ぐため)

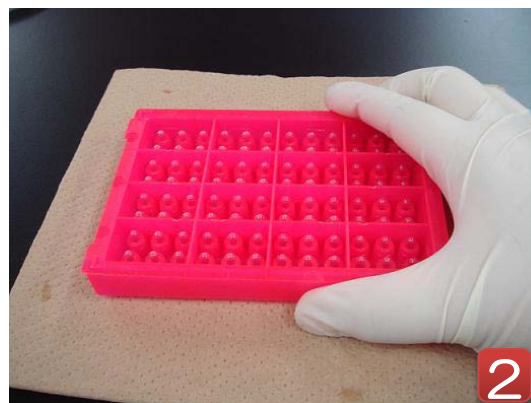


正確に
5 minutes !!



洗浄操作(1回)

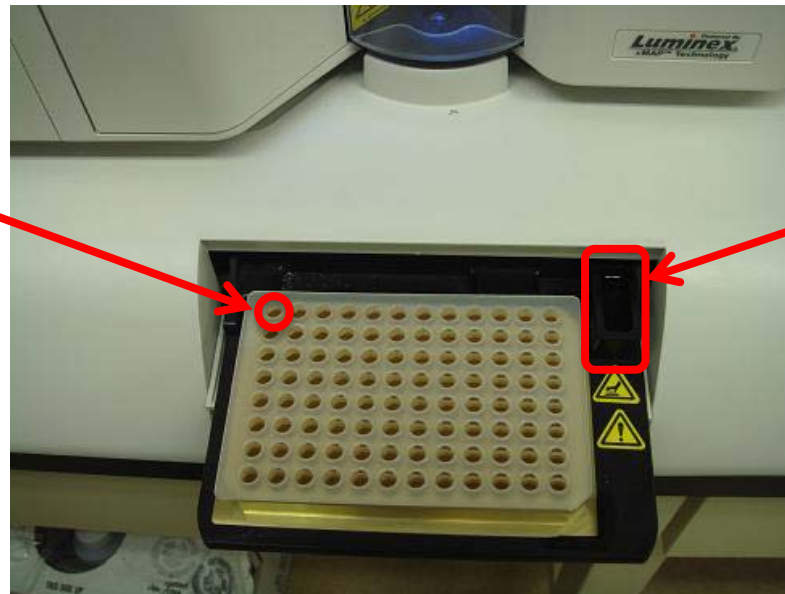
- ① Washing bufferを100ul添加し、シールを貼る
- ② 2000 × g、2分間、または1500 × g、3分間で遠心
- ③ フリッキングにより上清を除去
- ④ キムタオルで5秒間押しつけ、軽く5回タッピングする
- ⑤ ビーズのみの状態でボルテックス(ドライボルテックス)



⑤ 蛍光強度測定

- 洗浄後、Wash Bufferを70ul加え、全量をロープロファイルプレートに移し替え、LABScan 100 (Luminex)で測定
- 調製後すぐに測定しない場合は、プレートシールを貼り遮光で4℃保存(24時間以内)。
読み取る際はよくピペティング

A01のウェル

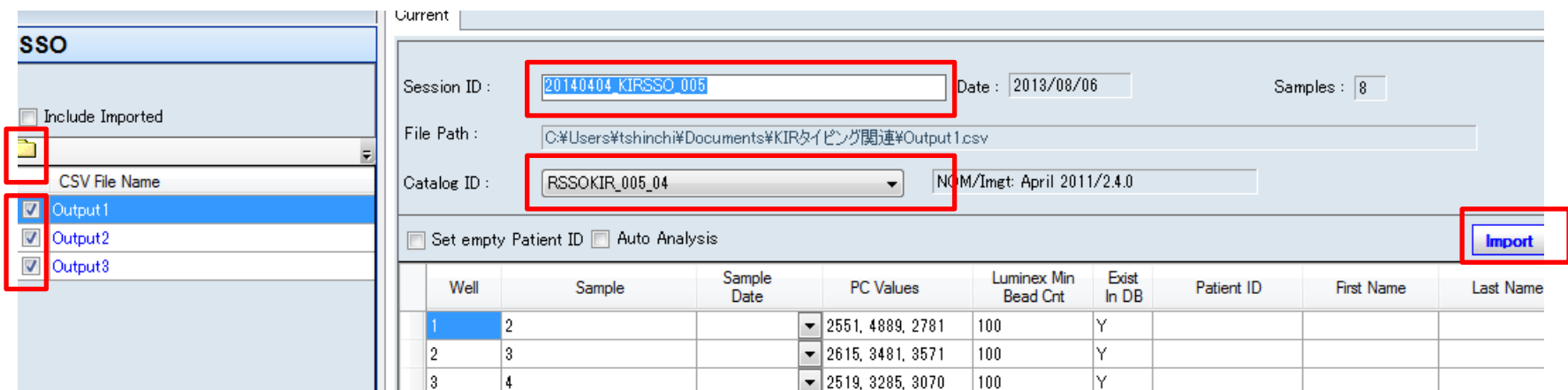


Reservoir Box
シース液を添加

HLA FUSION RESEARCHを使用した KIR SSOの解析

データのインポート

HLA Fusionにログイン (ID:1、パスワード:1)
画面左下のSSO>フォルダアイコン>ファイルを3種類選択>全てチェック



SSO

Include Imported

CSV File Name

- Output1
- Output2
- Output3

Current

Session ID : 20140404_KIRSSO_005 Date : 2013/08/06 Samples : 8

File Path : C:\Users\tshinch\Documents\KIRタイピング関連\Output1.csv

Catalog ID : RSSOKIR_005_04 NOM/Imgt: April 2011/2.4.0

Set empty Patient ID Auto Analysis **Import**

Well	Sample	Sample Date	PC Values	Luminex Min Bead Cnt	Exist In DB	Patient ID	First Name	Last Name
1	2		2551, 4889, 2781	100	Y			
2	3		2615, 3481, 3571	100	Y			
3	4		2519, 3285, 3070	100	Y			

Session IDを入力し、カタログIDを確認して、Impot

Summary画面

画面左のNavigatorをクリック。

各KIR遺伝子の有無がYESまたはNOで表示されます。YES*、NO*は、偽陽性または偽陰性反応が見られることを表しています。

Summary Control Values Bead Analysis

Export Print Preview

Session : 20140404_KIRSSO_005 Catalog : RSSOKIR_005_04 NOM: April 2011 - 2.4.0 Number of Sample(s): 8

Sample	More Test	KIR2DL1	Assign 2DL1	KIR2DL2	Assign 2DL2	KIR2DL3	Assign 2DL3	KIR2DL4	Assign 2DL4	KIR2DL5	Assign 2DL5	KIR2DP1	Assign 2DP1	KIR2DS1	Assign 2DS1	KIR2DS2	Assign 2DS2	KIR2DS3	Assign 2DS3
2	<input type="checkbox"/>	YES		NO		YES		YES		YES		YES		YES		NO		NO	
3	<input type="checkbox"/>	YES		YES		YES		YES		NO		YES		NO		YES		NO	
4	<input type="checkbox"/>	YES		NO		YES		YES		NO		YES		NO		NO		NO	
5	<input type="checkbox"/>	YES		NO		YES		YES		NO		YES		NO		NO		NO	
6	<input type="checkbox"/>	YES		NO		YES		YES		NO		YES		NO		NO		NO	
7	<input type="checkbox"/>	YES		NO		YES		YES		NO		YES		NO		NO		NO	
8	<input type="checkbox"/>	YES		NO		YES		YES		YES		YES		YES		NO		YES	
9	<input type="checkbox"/>	YES		NO		YES		YES		NO		YES		NO		NO		NO	

検体を解析していないので、の列は全て空欄になっています。
解析するとここに結果が表示されます。
各検体毎に解析する場合は、カラムをダブルクリックします。

検体の解析画面

HLA Fusion™ (Research)

Analyze Data Reports Data Sample Patient Info Profile Utilities LABXpress Help Exit

QC Rxn Local QC Patient/Sample Results Set Config

One Lambda QC ID # 002, Probe ID # KP49 Max Scale:

メーカーQC

QC

Raw Bead Info

Bead 002

Exclude Reset QC

今回の結果(ビーズ毎)

View Delta

KIR Results

Summary

Alleles Assignment for KIR2DL1: (527)

Final Assignment

Results Bead

KIR2DL1 KIR2DL2 KIR2DL3 KIR2DL4 KIR2DL5 KIR2DP1 KIR2DS1 KIR2DS2 KIR2DS3 KIR2DS4 KIR3DL1 KIR3DL2 KIR3DL3 KIR3DP1

Allele Pair

KIR2DL1*001 KIR2DL1*001

KIR2DL1*001 KIR2DL1*0020101

KIR2DL1*001 KIR2DL1*0020102

KIR2DL1*001 KIR2DL1*0020103

KIR2DL1*001 KIR2DL1*00301

KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030201

KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030202

KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030203

KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030204

KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030205

KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030206

KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030207

KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030208

KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030209

KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030210

Positive Mismatch Negative

全ビーズの反応グラフ

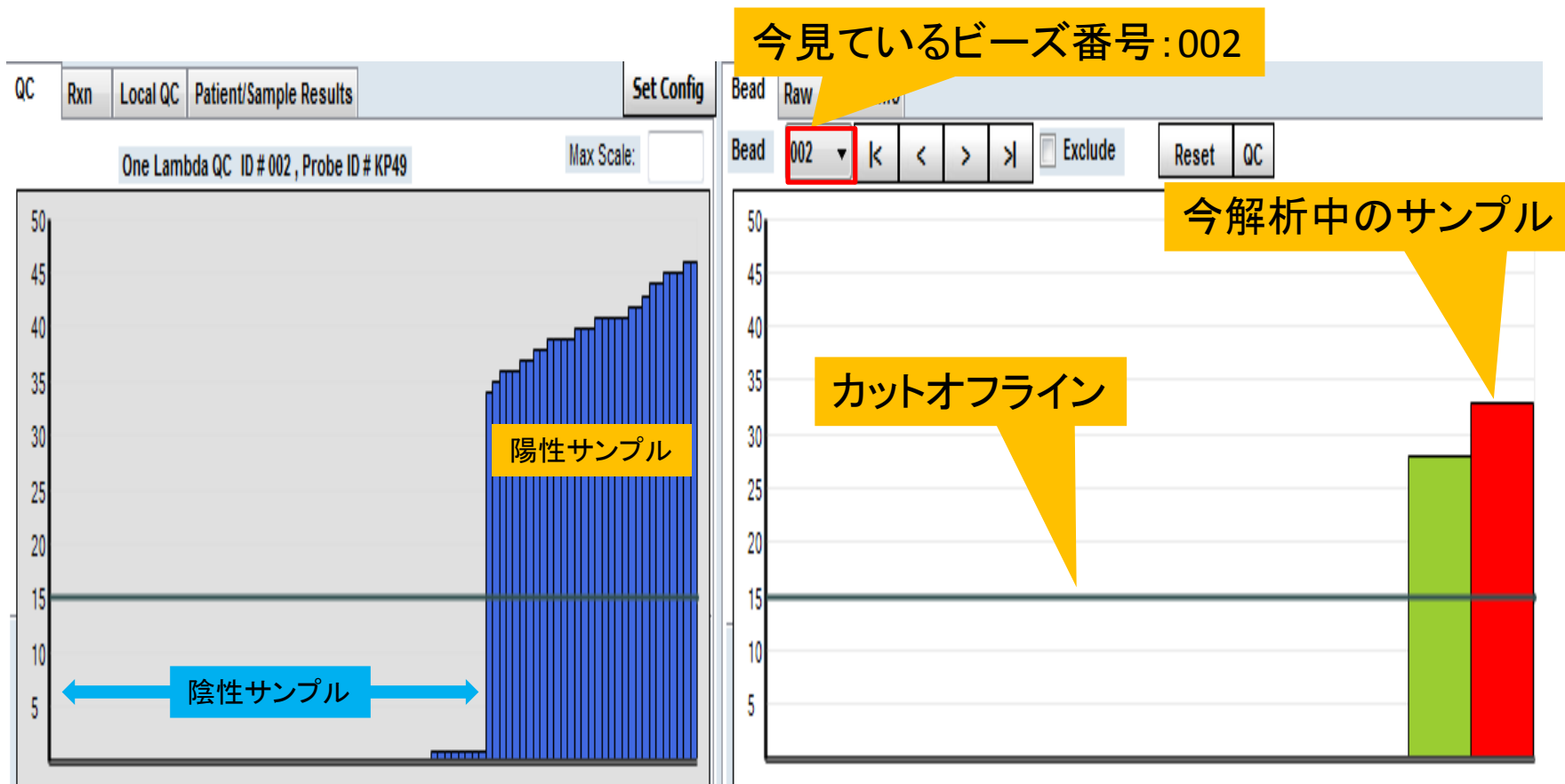
KIR遺伝子の測定結果
黄色:陽性、赤色:偽反応、白:陰性

User Comment:

System Comment:

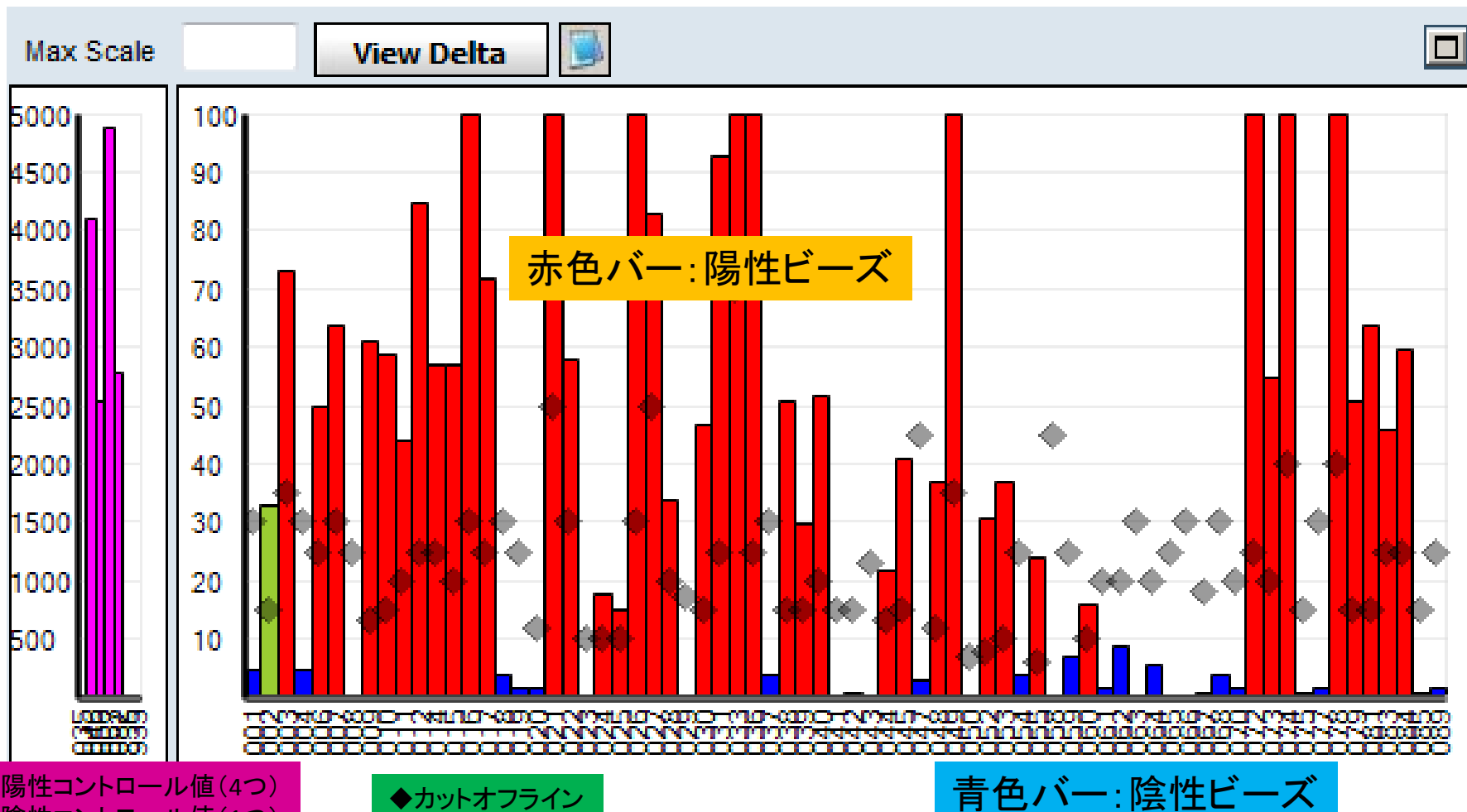
Well 1 PID LID SID 20140404_KIRSSO_005 CID RSSOKIR_005_04 NOM/Im

メーカーQCと今回の結果の比較



メーカーQCの反応と比較して、グラフの形状が乖離している場合は偽陰性、偽陽性の可能性を疑います。

全ビーズ反応グラフ



カットオフに近いビーズは要注意です。

結果のアサイン

ミスマッチ(赤色)が無い場合は、>>ボタンを押し、陽性のKIR遺伝子がアサインします。
ミスマッチがある場合は、ミスマッチが無くなるように、カットオフラインの検討を行います。

KIR Results

Summary

Results	Bead
KIR2DL1	
KIR2DL2	
KIR2DL3	
KIR2DL4	
KIR2DL5	
KIR2DP1	
KIR2DS1	
KIR2DS2	
KIR2DS3	
KIR2DS4	
KIR2DS5	

Alleles Assignment for KIR2DL1: (527)

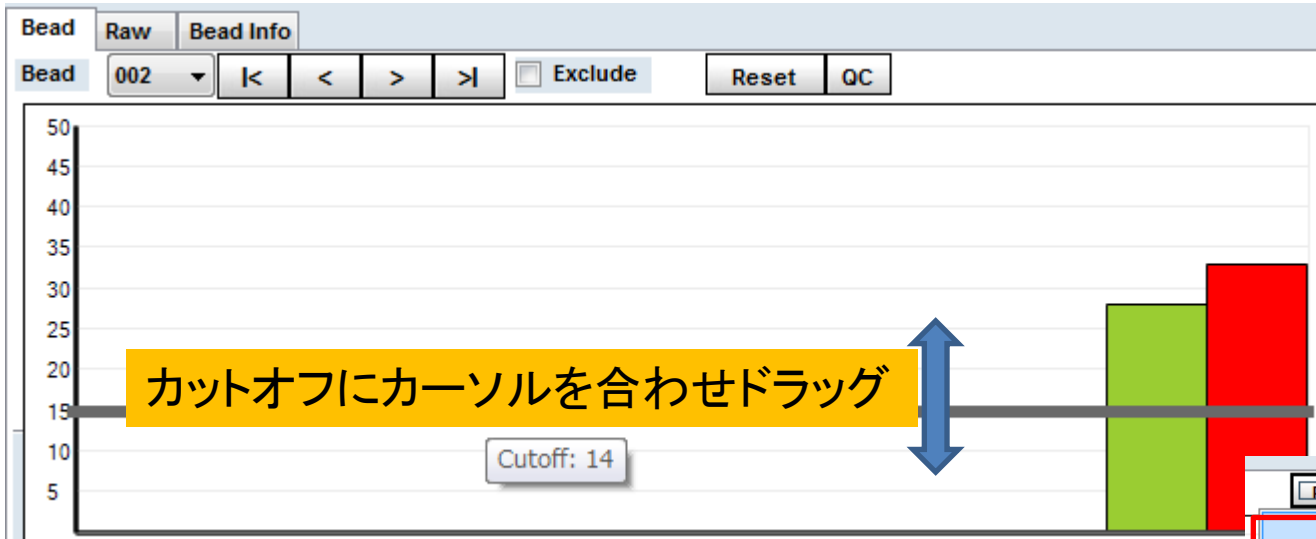
Allele Pair
KIR2DL1*001 KIR2DL1*001
KIR2DL1*001 KIR2DL1*0020101
KIR2DL1*001 KIR2DL1*0020102
KIR2DL1*001 KIR2DL1*0020103
KIR2DL1*001 KIR2DL1*00301
KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030201
KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030202
KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030203
KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030204
KIR2DL1*001 KIR2DL1*0030205

Final Assignment

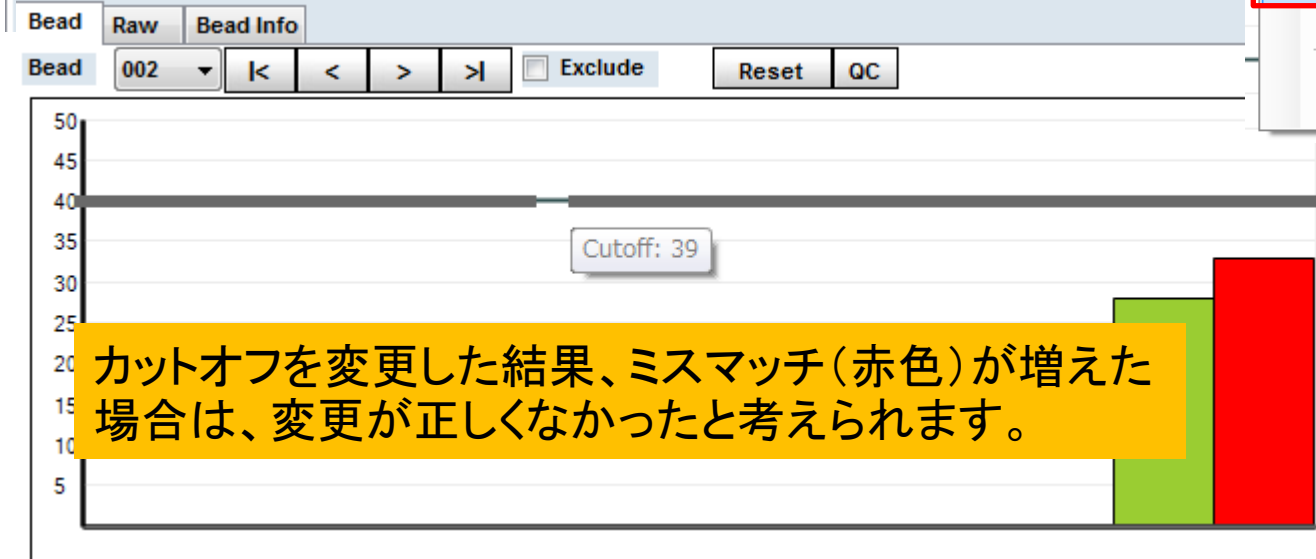
KIR2DL1
KIR2DL3
KIR2DL4
KIR2DL5
KIR2DP1
KIR2DS1
KIR2DS4
KIR2DS5
KIR3DL1
KIR3DL2
KIR3DL3

Positive Mismatch Negative

カットオフの変更の仕方



Results	Bead
KIR2DL1	
KIR2DL2	
KIR2DL3	
KIR2DL4	
KIR2DL5	
KIR2DP1	
KIR2DS1	
KIR2DS2	
KIR2DS3	
KIR2DS4	
KIR2DP5	



Reset QC

Current Sample : Current Bead to OLI Default

Current Sample : All Beads to OLI Default

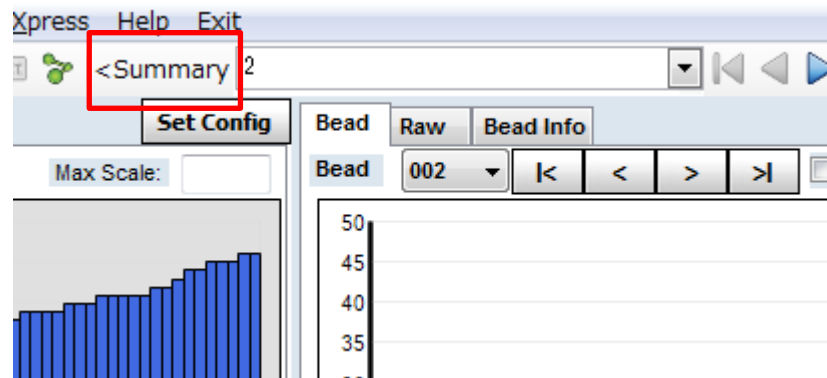
Current Sample : All Beads to User Setting

変更をリセット可能

Results	Bead
KIR2DL1	
KIR2DL2	
KIR2DL3	
KIR2DL4	
KIR2DL5	001.00
KIR2DP1	
KIR2DS1	
KIR2DS2	
KIR2DS3	
KIR2DS4	
KIR2DP5	

解析結果の保存

- ミスマッチが全て消えたら、陽性の遺伝子をアサインし、解析が終了したら必ず、画面下のSaveを押します。
- 画面中央上のsummaryより解析前のSummaryタブに戻ります。



データのエクスポート

全てのサンプルで解析が終了した場合、の列にYまたはNと表示されます。
全て記入されている事を確認して、Exportから、Exel形式で保存します。

Export

Print

Preview

Session : 20140404_KIRSSO_005

Sample	KIR2DL1	Assign 2DL1	KIR2DL2	Assign 2DL2	KIR2DL3	Assign 2DL3	KIR2DL4	Assign 2DL4
2	YES	Y	NO	N	YES	Y	YES	Y
3	YES	Y	YES	Y	YES	Y	YES	Y
4	YES	Y	NO	N	YES	Y	YES	Y
5	YES	Y	NO	N	YES	Y	YES	Y
6	YES	Y	NO	N	YES	Y	YES	Y
7	YES	Y	NO	N	YES	Y	YES	Y
8	YES	Y	NO	N	YES	Y	YES	Y
9	YES	Y	NO	N	YES	Y	YES	Y

解析データの信頼性の確認

- ほぼ陽性の KIR3DL3,3DP1,2DL4, 3DL2が陰性になっていないか(稀に例外あり)
- 2DS2-2DL2、2DL3-2DP1-2DL1、3DL1 - 2DS4、3DS1-2DS1の組み合わせに陽性・陰性の不一致がないか(稀に例外あり)

Haplotype	Cen motif	Centromeric part									RS	Telomeric part							Tel motif	
		3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5B	2DS3/5	2DP1	2DL1	3DP1		2DL4	3DL1	3DS1	2DL5A	2DS3/5	2DS1	2DS4		3DL2
A	Cen-A1																		Tel-A1	
	Cen-A1																			Tel-B1
B	Cen-B1																			Tel-A1
	Cen-B2																			Tel-A1
	Cen-B1																			Tel-B1
	Cen-B2																			Tel-B1

KIRハプロタイプの確認

- A,Bハプロタイプ A(AA), Bx(AB,BB)の判定
 - 活性化型KIR(S)としてKIR2DS4のみをもつ A(AA), 日本人約半数
 - KIR2DS4とともに他の活性化KIRももつ Bx(AB)
 - KIR2DS4ーである (BB) 日本人はまれ
- セントロメア側(Cen)
 - KIR2DL3+, KIR2DL2ー, KIR2DS2ー Cen A/A
 - KIR2DL3+, KIR2DL2+, KIR2DS2+ Cen A/B
 - KIR2DL3ー, KIR2DL2+, KIR2DS2+ Cen B/B(ごくまれ)
- テロメア側(Tel)
 - KIR3DL1+, KIR2DS4+, KIR2DS1ー, KIR3DS1ー Tel A/A
 - KIR3DL1+, KIR2DS4+, KIR2DS1+, KIR3DS1+ Tel A/B
 - KIR3DL1ー, KIR2DS4ー, KIR2DS1+, KIR3DS1+ Tel B/B

エクセルでのハプロタイプ解析例



Haplotype	Cen	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5B	2DS3/5	2DP1	2DL1	3DP1		2DL4	3DL1	3DS1	2DL5A	2DS3/5	2DS1	2DS4	3DL2	Tel		
A	Cen-A1																				Tel-A1	
B	Cen-A1																				Tel-B1	
	Cen-B1																				Tel-A1	
	Cen-B2																				Tel-A1	
	Cen-B1																				Tel-B1	
	Cen-B2																				Tel-B1	
	OLI	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5	2DS3	2DP1	2DL1	3DP1	RS	2DL4	3DL1	3DS1	2DL5	2DS5	2DS1	2DS4	3DL2	ハプロタイプ		
Sample	LAB	100%	44%	44%	92%	44%	20%	95%	95%	95%		100%	100%	36%	44%	24%	37%	58%	100%	A/B	Cen	Tel
1	LAB A	8	1	1	8	1	1	8	8	8		8	8	1	1	1	1	8	8	A/A	A/A	A/A
2	LAB A	8	1	1	8	1	1	8	8	8		8	8	1	1	1	1	8	8	A/A	A/A	A/A
3	LAB A	8	1	1	8	1	1	8	8	8		8	8	1	1	1	1	8	8	A/A	A/A	A/A
4	LAB A	8	1	1	8	1	1	8	8	8		8	8	1	1	1	1	8	8	A/A	A/A	A/A
5	LAB A	8	1	1	8	1	1	8	8	8		8	8	1	1	1	1	8	8	A/A	A/A	A/A
6	LAB A	8	1	1	8	8	1	8	8	8		8	8	8	8	8	8	8	8	A/B	A/A	A/B
7	LAB A	8	1	1	8	8	8	8	8	8		8	8	8	8	1	8	8	8	A/B	A/A	A/B
8	LAB A	8	1	1	8	8	1	8	8	8		8	8	8	8	8	8	8	8	A/B	A/A	A/B
9	LAB A	8	8	8	8	1	1	8	8	8		8	8	1	1	1	1	8	8	A/B	A/B	A/A
10	LAB A	8	8	8	8	1	1	8	8	8		8	8	1	1	1	1	8	8	A/B	A/B	A/A
11	LAB A	8	8	8	8	1	1	8	8	8		8	8	1	1	1	1	8	8	A/B	A/B	A/A
12	LAB A	8	8	8	8	1	1	8	8	8		8	8	1	1	1	1	8	8	A/B	A/B	A/A
13	LAB A	8	8	8	8	1	1	8	8	8		8	8	1	1	1	1	8	8	A/B	A/B	A/A
14	LAB A	8	8	8	8	8	1	8	8	8		8	8	8	8	8	8	8	8	A/B	A/B	A/B
15	LAB A	8	8	8	8	8	1	8	8	8		8	8	8	8	8	8	8	8	A/B	A/B	A/B
16	LAB A	8	8	8	8	8	1	8	8	8		8	8	8	8	8	8	8	8	A/B	A/B	A/B
17	LAB A	8	8	8	1	1	1	1	1	1		8	8	1	1	1	1	8	8	A/B	B/B	A/A
18	LAB A	8	8	8	1	1	1	1	1	1		8	8	1	1	1	1	8	8	A/B	B/B	A/A
19	LAB A	8	8	8	1	8	8	8	8	8		8	8	8	8	1	8	8	8	A/B	B/B	A/B
45	LAB A	8	8	8	8	8	8	8	8	8		8	1	8	8	1	8	1	8	B/B	A/B	B/B

LABTypeトラブルシューティング
こんな時、どうすれば？！

PCR増幅がうまくいきません・・・

- DNAの純度・濃度は？
 - 20ng/uL: 20～60ng/uL推奨なので、問題なし。
- サーマルサイクラー？
 - 9700を使用しています。ヘッドはゴールドです。
 - 問題なし。ただし9700は**アルミヘッド不可です！**
- Taq Polymeraseは？
 - Ampli Taq を使用しています。
 - **問題ありません。Ampli Taq Goldは不可です！**
- 他に原因は??

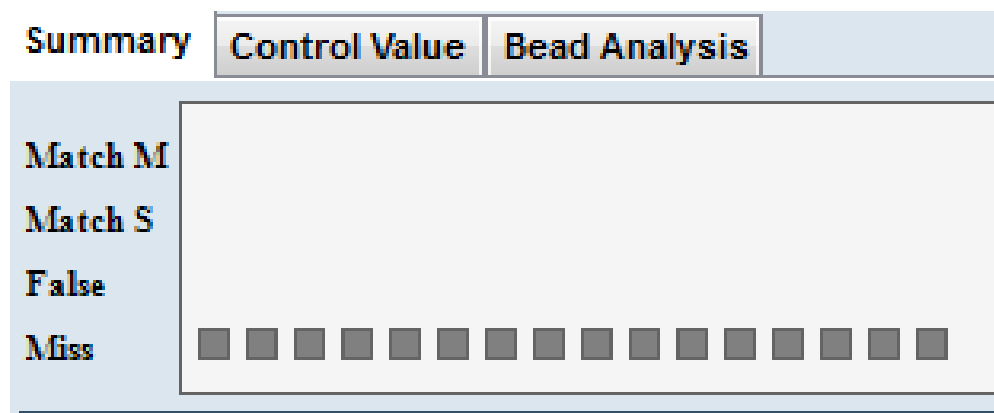
サーマルサイクラーの電源は大丈夫ですか??



- たこ足配線は、要注意です！
 - 特に他の大型機器と共有している場合や、同じ電源で同時に二台のサーマルサイクラーを使用すると、電圧が下がってしまいうまく増幅しない場合があります！
 - 単一の電源の使用をお願いします！
 - 電圧のチェックをお勧めします！
 - 100V下回ると、要注意です！
 - 100V以上でも電圧が不安定な場合は注意

LABType HDのBローカスを使用しましたが、タイプが全然きまりません・・・

- ポジティブコントロールは正常 = PCR OK?
- どうしてこのような結果になったのでしょうか？



Exon2	Exon3
3143	1761
2861	1879
1381	1226
2580	1452
1544	1029
2470	1134
1098	1797
1164	1159

DNAのコンタミネーション？

- いいえ、他のローカス(A、DR)は問題なく結果が得られています。
- Bローカス用のプライマーだけコンタミネーション？
 - いいえ。新しいチューブの同一ロットのプライマーで試したが、結果は変わりませんでした。
 - 他に原因は？！

プライマーとビーズのロット？

- プライマーは、ロット毎に変更されます！それに応じてビーズも変更されます。
 - 今回は、プライマーとビーズのロットがありませんでした。
 - 正しいプライマーで実験すると問題なく結果が得られました。

プライマーとビーズのロットに注意！



- プライマーは各ローカス毎、各ロット毎にプライマーが異なります！
- プライマーとビーズのロットの組み合わせに関しては、ワンラムダのHPをご参照ください。
- <http://www.onelambda.com/product-attachment.aspx?c1=molecular&c2=labtype-sup-sup-&c3=labtype-sup-sup-sso&c4=2&c5=16&c6=54>

Path: Molecular > LABType® > LABType® SSO
Product Documentation

Click **here** to download the latest Adobe Reader. (Adobe Reader 9.0 or higher is required to view documentation.)



MSDS



MSDS Streptavidin



Product Insert
Streptavidin



Product Insert



Product Insert
Reference Table



Reference Table
BeadPrimer

RSSOH2B1		
Bead Lot	Supplement Lot	Primer Lot
4.1		10.1
5.1		10.1
5.2		10.1
5.2		1.1
6.1		1.1
7.1		2.1
7.1	7A.1	2.1
7.1	7B.1	2.1
8.1		3.1

多検体の時は良いが、少数検体で試験するとPCR増幅がうまくいきません・・・



- 試薬の量はプロトコル通りですか？特に、Ampli Taqの量は、確実に0.2 uL入れていますか？
 - いいえ、1uL用のピペットを使用しています。少し多めに入ってしまったています
- 試薬の量は非常に重要です。特にAmpli Taqは1検体あたり、0.2 uLと非常に少ないので誤差がおおきなってしまう。
 - 何か良い解決策はありますか？！

少数検体時にお勧めのプロトコル



D-mixとTaqを混ぜた各ローカス共通のPre-mix溶液を作製し解決！

1. プライマー、DNA、D-mixを室温で溶かした後、軽くスピンドウンし、氷上においておく。以降の試薬の分注は全て氷上で行う。
2. DNAは使用前によくピペッティング。（* ボルテックスはしない）。DNA 2ulずつ、各ウェルに分注しスピンドウン。**目視にて、DNAが分注されていることを必ず確認。**量が少ないウェル等が無いかも注意する。
3. 各プライマーをしっかりとボルテックスし、軽くスピンドウンし4ulずつ、DNAの入ったウェルに分注しよくピペッティングする。軽くスピンドウンする。
4. D-mixはしっかりとボルテックスし、スピンドウンする。Taqはボルテックスしない。**D-mix: $13.8 \times \{n(\text{ローカス}) + \alpha\}$ と Taq Polymerase $0.2 \times (n + \alpha)$ をしっかりとピペッティングで混合する。**
5. 上記の混合溶液を、プライマー、DNAが分注されたウェルに14ulずつ分注し、ピペッティングによりしっかりと混合する。シールをしっかりと貼る。
6. PCRは、サーマルサイクラーが80～90°Cになってから、反応チューブを入れる。（ホットスタート）

付録

トラブルシューティングまとめ

サンプル調整

- DNA濃度...メーカー推奨の範囲内(20-60ng/uL)にあるか ※HDの場合20ng/uLが理想的です
- DNA溶液中のEDTA濃度...滅菌蒸留水(またはTris)で溶解してあること、EDTAが入っていない溶液であるか (DNA溶液のEDTA濃度は、0.5 mM以下にしてください)
- ヘパリン加血検体からDNAを抽出していないか...*Taq* DNAポリメラーゼの反応と相性が悪いからです
- DNA純度... $OD_{260}/280 = 1.65$ 以上かどうかにあるか
- *Taq* ポリメラーゼ...メーカー指定の製品を使用しているか (Applied Biosystems社の*Ampli Taq*を使用します。*Ampli Taq Gold*は使用不可です。)

PCR試薬調整

- 調製前に、DNA検体、D-mixを十分にvortexしてあるか
- *Taq* DNAポリメラーゼをvortexしていないか
- 黄色に変色したD-mixを使っていないか
- D-mix/*Taq*溶液をウェルに分注後、十分にvortexしてあるか
- 確実にシールをしてあるか...蒸発の原因になります
- サンプル量が少ないため、**確実にウェルに分注されたかどうか目視で確認したかどうか**
- 全試薬を入れた後、試薬がウェルの底にあるかどうか確認したかどうか

サーマルサイクラー

- Gene Amp 9700サーマルサイクラーの場合、9600モードでPCRを行っているか
- Gene Amp **9600または9700(アルミヘッド不可)**、**Veriti**のサーマルサイクラーを使用しているか
- サーマルサイクラーのプログラムを開始する直前に、サンプルを機械に入れたかどうか
- PCRサーマルサイクラーを使用する場合、**同一電気回路で他の機械を使用していないか**どうか
- ※電圧が一定でなくなるため増幅効率にむらが出る場合があります。

ハイブリダイゼーション

- 試薬は正しく保存されていたかどうか
- DNA増幅サンプルとDenaturation Bufferを良く混和したかどうか、混和後、溶液の色がピンク色になったかどうか
- ビーズミックス溶液を作製時にビーズをピペットでよく攪拌したかどうか
- Neutralization Buffer を加えたとき、よく混和し溶液が透明になったかどうか
- ビーズミックスを加えるとき、氷上でおこなったかどうか
- ハイブリダイゼーションを行うは、60°Cに温まったサーマルサイクラーへサンプルを入れてインキュベーションしたかどうか
- ハイブリダイゼーション終了後、素早くwash bufferを入れたかどうか、もしくはプレートを冷やしながらか行ったか？
- 洗浄後、フリッキングはしっかり行ったかどうか
- ドライボルテックスを行ったかどうか

測定～解析

- LUMINEX
- 機械のメンテナンスは定期的に行っているか
- 機械の針の高さは調整されているか
- Calibration beads, control beads を用いて、luminexの調整をしたかどうか
- 使用するTemplateは間違いないかどうか
-
- 解析
- 解析ソフトのカタログファイルのバージョンが最新であるかどうか
- 正しくデータを解析ソフトにインポートしたかどうか
- Positive control が増幅しているかどうか確認する
- Negative controlが増幅していないかどうか確認する
- 検体のバックグラウンドを確認して、陰性ビーズのバックグラウンドが低いかどうか確認する
- 解析する場合、頻度、連鎖不平衡、人種、家族などの情報を網羅して解析しているかどうか
- DNAがコンタミしていることはないかどうか