

INNO-LiPA 使用方法 (PCR調製編)

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認ください。

内容:

コード No.	品名	梱包単位	保存温度	輸送温度
IG-80332	INNO-LiPA HLA-A Update	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20°C)	冷蔵/冷凍(-20°C)
IG-80634	INNO-LiPA HLA-B Update Plus	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20°C)	冷蔵/冷凍(-20°C)
IG-80342	INNO-LiPA HLA-C	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20°C)	冷蔵/冷凍(-20°C)
IG-80344	INNO-LiPA HLA-DPB	20 Tests	冷蔵(4°C)	冷蔵(4°C)
IG-80703	INNO-LiPA HLA-DQA1	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20°C)	冷蔵/冷凍(-20°C)
IG-80336	INNO-LiPA HLA-DQB1 Update	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20°C)	冷蔵/冷凍(-20°C)
IG-80340	INNO-LiPA HLA-DRB decoder	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20°C)	冷蔵/冷凍(-20°C)
IG-80635	INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20°C)	冷蔵/冷凍(-20°C)

必要な試薬:

- INNO-LiPA HLA-DPBのみ *Taq* DNA polymeraseが添付されていないため、別途ご購入ください。
Ampli *Taq* DNA polymerase (Applied Biosystems) を推奨します。

1. 準備:

- 使用前に、サーマルサイクラーのプログラム調節を行ってください。このプロトコールは、Gene Amp™ PCRチューブ (0.5 mL)とPE-480サーマルサイクラー、またはMicro Amp™ PCRチューブ (0.2 mL)とPE-9700サーマルサイクラーで最適に増幅されるようにデザインされています。
- PCRサンプルを調製する前に、サーマルサイクラーの電源を入れヒートブロックを予め温めて(95°C)おき、直ちにPCRサイクルを開始できるようにします。

2. 操作方法:

2.1 PCRの調製

2.1.1 INNO-LiPA HLA-A Multiplex

- バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスします (特にLiPA-*Taq*)。
 - ◇ HLA-A Amplification Buffer 0.3 mL (AB)
dNTPs、0.05%NaN₃が入った黄色キャップのチューブ
 - ◇ HLA- A Primer Solution 0.3 mL (HLA-A)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05% NaN₃が入った桃色キャップのチューブ
 - ◇ LiPA-*Taq* 35 μL (LT)
Taq DNA polymerase (2U/μL)、0.05% NaN₃が入った紫色のキャップのチューブ
- Genomic DNAを0.02~1.5 μg/μLの濃度になるようにTE bufferまたは滅菌蒸留水で希釈します。純度は (A260/A280) が1.5以上のDNAを使用します。
- 必要なバイアルの数 (N) を決めます。 :
DNAサンプル数 (N) + 1 (陰性コントロール : DNAを添加しない) + 1
オートクレーブ滅菌した1.5 mLチューブに、フィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製します。この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 μL) です。

23.75 μL	× N	オートクレーブ済蒸留水	
10 μL	× N	Amplification buffer	(AB: 黄色キャップ)
10 μL	× N	HLA- A Primer Solution	(HLA- A: 桃色キャップ)
1.25 μL	× N	LiPA- <i>Taq</i>	(LT: 紫色キャップ)
- 優しくボルテックスにかけ、PCRチューブにマスターミックスを45 μLずつ小分けします。
- 調製したGenomic DNA 5 μL (0.1~7.5 μg) をピペットで添加します。必要ならば (例・PE-480を使用する場合)、各チューブにミネラルオイルを2滴 (≒ 40μL) ずつ添加します。また、陰性コントロールチューブに蒸留水 (DNA無し) 5 μLを添加します。
- 合計50 μLのDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーへ入れます。

2.1.2 INNO-LiPA HLA B Multiplex Plus

- バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスします (特にLiPA-Taq)。
 - ◇ HLA-B Amplification Buffer 0.3 mL (AB)
dNTPs、0.05% NaN₃ が入った黄色キャップのチューブ
 - ◇ HLA-B Primer Solution 0.3 mL (HLA-B)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05 % NaN₃ が入った緑色キャップのチューブ
 - ◇ LiPA-Taq 35 μL (LT)
Taq DNA polymerase (2U/μL)、0.05 % NaN₃ が入った紫色キャップ のチューブ
 - ◇ HLA-Bw4 Primer Solution 0.07 mL (HLA-Bw4; HLA-B)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05 % NaN₃ が入った赤色キャップのチューブ
- Genomic DNAを0.02~1.5 μg/μLの濃度になるようにTE bufferまたは滅菌蒸留水で希釈します。
純度は (A260/A280) が1.5以上のDNAを使用します。
- 必要なバイアルの数 (N) を決めます。 :
N = DNAサンプル数 + 1 (陰性コントロール : DNAを添加しない) + 1
オートクレーブ滅菌した1.5 mLチューブに、フィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製します。この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 μL) です。

23.75 μL	× N	オートクレーブ済蒸留水	
10 μL	× N	Amplification buffer	(AB: 黄色キャップ)
10 μL	× N	HLA-B Primer Solution	(HLA-B: 緑色キャップ)
		またはHLA-Bw4 Primer Solution	またはBw4: 赤キャップ)
1.25 μL	× N	LiPA-Taq	(LT: 紫色キャップ)
- 優しくボルテックスにかけ、PCRチューブにマスターミックスを45 μLずつ分注します。
- 調製したGenomic DNA 5 μL (0.1~7.5 μg) をピペットで添加します。必要ならば (例・PE-480を使用する場合)、各チューブにミネラルオイルを2滴 (≒ 40 μL) ずつ添加します。陰性コントロールチューブに蒸留水 (DNA無し) 5 μLを添加します。
- 合計50 μLのDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーへ入れます。

2.1.3 INNO-LiPA HLA-C Multiplex

- バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスします。(特にLiPA-*Taq*)。
 - ◇ HLA-C Amplification Buffer 0.3 mL (AB)
dNTPs、0.05 % NaN₃が入った黄色キャップのチューブ
 - ◇ HLA-C Primer Solution 0.3 mL (HLA-B)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05 % NaN₃が入った青色キャップのチューブ
 - ◇ LiPA-*Taq* 35 μL (LT)
Taq DNA polymerase (2U/μL)、0.05 % NaN₃が入った紫色キャップのチューブ
- Genomic DNAを0.01~0.25 μg/μLの濃度になるようにTE bufferまたは滅菌蒸留水で希釈します。
純度は (A260/A280) が1.5以上のDNAを使用します。
- 必要なバイアルの数 (N) を決めます。 :
N = DNAサンプル数 + 1 (陰性コントロール ; DNAを添加しない) + 1
オートクレーブ滅菌した1.5 mLチューブにフィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製します。この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 μL) です。

23.75 μL	× N	オートクレーブ済蒸留水	
10 μL	× N	Amplification buffer	(AB: 黄色キャップ)
10 μL	× N	HLA- C Primer Solution	(HLA- C: 青色キャップ)
1.25 μL	× N	LiPA- <i>Taq</i>	(LT: 紫色キャップ)
- 優しくボルテックスにかけ、PCR チューブにマスターミックスを 45 μL ずつ分注します。
- 調製した Genomic DNA 5 μL (0.1~7.5 μg) をピペットで添加します。
必要ならば (例・PE-480 を使用する場合)、各チューブにミネラルオイルを 2 滴 (≒40 μL) ずつ添加します。陰性コントロールチューブに蒸留水 (DNA 無し) 5 μL を添加します。
- 合計50 μLのDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーへ入れます。

2.1.4 INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus

- バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスします (特にLiPA-*Taq*)。
 - ◇ DRB Amplification Buffer 0.3 mL (AB)
dNTPs、0.05 % NaN₃が入った透明キャップのチューブ
 - ◇ DRB1 Primer Solution 0.3 mL (DRB1)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、防腐剤として0.05%NaN₃が入った黄色キャップのチューブ
 - ◇ LiPA-*Taq* 35 μL (LT)
Taq DNA polymerase (2U/μL)、0.05%NaN₃が入った紫色キャップ のチューブ
 - ◇ DRB1*03, 11, 13, 14 Primer Solution
ビオチン化プライマー、MgCl₂、防腐剤として0.05%NaN₃を含みます。
使用する前に完全に溶かしてください。
- Genomic DNAを0.01 μg/μL以上の濃度になるようにTE bufferまたは滅菌蒸留水で希釈します。
純度は (A260/A280) が1.5以上のDNAを使用します。
- 必要なバイアルの数(N)を決めます。 :
$$N = \text{DNAサンプル数} + 1 \text{ (陰性コントロール ; DNAを添加しない)} + 1$$

オートクレーブ滅菌した1.5 mLチューブにフィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製します。この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 μL) です。

24 μL	× N	オートクレーブ済蒸留水	
10 μL	× N	Amplification buffer	(AB: 透明キャップ)
10 μL	× N	HLA- DRB1 Primer Solution	(HLA- DRB1: 黄色キャップ
		またはDRB1*03,11,13,14	またはDRB1*03,11,13,14: 青色キャップ)
1 μL	× N	LiPA- <i>Taq</i>	(LT: 紫色キャップ)
- 優しくボルテックスにかけ、PCRチューブにマスターミックスを45 μLずつ分注します。
- 調製したGenomic DNA 5 μL (0.05~0.1 μg) をピペットで添加します。必要ならば(例・PE-480を使用する場合)、各チューブにミネラルオイルを2滴 (≒ 40 μL) ずつ添加します。陰性コントロールチューブに蒸留水(DNA無し) 5 μLを添加します。
- 合計50 μLのDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーへ入れます。

2.1.5 INNO-LiPA HLA-DRB decoder Amplification

- バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスします (特にLiPA-*Taq*)。
 - ◇ DRB Amplification Buffer 0.3 mL (AB)
dNTPs、0.05 % NaN₃が入った透明キャップのチューブ
 - ◇ DRB1 + 3 + 4 + 5 Primer Solution 0.3 mL (DRB1+ 3 + 4 + 5)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05%NaN₃が入ったオレンジ色のキャップのチューブ
(DRB1+ 3 + 4 + 5 alleleの第2エクソンを増幅します)
 - ◇ 86G Primer Solution 0.3 mL (86G)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05 % NaN₃が入った緑色のキャップのチューブ
(コドン86のアミノ酸配列がGまたはDを示すDRB alleleの第2エクソンを配列特異的に増幅)
 - ◇ 86V Primer Solution 0.3 mL (86V)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05 % NaN₃が入った茶色のキャップのチューブ
(コドン86のアミノ酸配列がVを示すDRB alleleの第2エクソンを配列特異的に増幅)
 - ◇ DRB1 Primer Solution 0.3 mL (DRB1)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05 % NaN₃が入った黄色のキャップのチューブ
(DRB1 アリルの第2エクソンを増幅)
 - ◇ LiPA-*Taq* 35 μL (LT)
Taq DNA polymerase (2U/μL)、0.05 % NaN₃が入った紫色のキャップのチューブ
- Genomic DNAを0.01 μg/μL以上の濃度になるようにTE bufferまたは滅菌蒸留水で希釈します。
純度は(A260/A280)が1.5以上のDNAを使用します。
- 必要なバイアルの数(N)を決めます。
N = DNAサンプルの数 + 1 (陰性コントロール ; DNAを添加しない) + 1
オートクレーブした1.5 mLチューブにフィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製します。いずれも、この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 μL) です。
 - ◇ DRB1+3+4+5、86Vサンプルの調製

24.5 μL	× N	オートクレーブ済蒸留水	
10 μL	× N	Amplification buffer	(AB: 透明キャップ)
10 μL	× N	Primer Solution (DRB1+3+4+5または86V)	(1+3+4+5: 橙色キャップ または86V: 茶色キャップ)
0.5 μL	× N	LiPA- <i>Taq</i>	(LT: 紫色キャップ)
 - ◇ DRB1、86Gサンプルの調製

24 μL	× N	オートクレーブ済蒸留水	
10 μL	× N	Amplification buffer	(AB: 透明キャップ)
10 μL	× N	Primer Solution (86GまたはDRB1)	(86G: 緑色キャップ またはDRB1: 黄色キャップ)
1 μL	× N	LiPA- <i>Taq</i>	(LT: 紫色キャップ)
- 優しくボルテックスにかけ、PCRチューブにマスターミックスを45 μLずつ分注します。
- 調製したGenomic DNA 5 μL (0.05~0.1 μg) をピペットで添加します。必要ならば(例・PE-480を使用する場合)、各チューブにミネラルオイルを2滴 (≒ 40 μL) ずつ添加します。陰性コントロールチューブに蒸留水(DNA無し) 5 μLを添加します。
- 合計50 μLのDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーへ入れます。

2.1.6 INNO-LiPA HLA-DQB1 Multiplex

- バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスします。(特にLiPA-Taq)。
 - ◇ DQB1 Amplification Buffer 0.3 mL (AB)
dNTPs、0.05 % NaN₃が入った透明キャップのチューブ
 - ◇ DQB1 Multiplex 0.3 mL (DQB1)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05 % NaN₃が入った緑色キャップのチューブ
 - ◇ LiPA-Taq 35 μL (LT)
Taq DNA polymerase (2U/μL)、0.05 % NaN₃が入った紫色キャップのチューブ
- Genomic DNAを0.02~1.5 μg/μLの濃度になるようにTE bufferまたは滅菌蒸留水で希釈します。
純度は(A260/A280)が1.5以上のDNAを使用します。
- 必要なバイアルの数(N)を決めます。 :
N = DNAサンプルの数 + 1 (陰性コントロール ; DNAを添加しない) + 1
オートクレーブした1.5 mLチューブにフィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製します。 いずれも、この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 μL) です。

24 μL	× N	オートクレーブ 蒸留水	
10 μL	× N	Amplification buffer	(AB: 透明キャップ)
10 μL	× N	DQB1 Primer Solution	(HLA- DQB1: 緑色キャップ)
1 μL	× N	LiPA-Taq	(LT: 紫色キャップ)
- 優しくルテックスにかけ、PCRチューブにマスターミックスを45 μLずつ分注します。
- 調製したGenomic DNA 5 μL (0.1~7.5 μg) をピペットで添加します。必要ならば(例・PE-480を使用する場合)、各チューブにミネラルオイルを2滴 (≒40 μL) ずつ添加します。陰性コントロールチューブに蒸留水 (DNA無し) 5 μLを添加します。
- 合計50 μLのDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーへ入れます。

2.1.7 INNO-LiPA HLA-DPB Amplification

- バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスします。
 - ◇ Taq DNA polymeraseが添付されておりませんので、別途ご購入ください。
Ampli Taq DNA polymerase (Applied Biosystems) をお勧めいたします。
 - ◇ DPB Amplification Buffer 3 mL (AB)
dNTPsと、防腐剤として0.05%NaN₃入った透明キャップのチューブ
 - ◇ DPB Primer Solution 0.3 mL (DPB1)
ビオチン化プライマー、0.05 % NaN₃ が入った黄色キャップのチューブ
 - ◇ MgCl₂ 3 mL
MgCl₂、0.05 % NaN₃が入った薄紫色キャップのチューブ
- Genomic DNAを0.02~0.1 µg/µLの濃度になるようにTE bufferまたは滅菌蒸留水で希釈します。
- 必要なバイアルの数(N)を決めます。 :
$$N = \text{DNAサンプルの数} + 1 (\text{陰性コントロール ; DNAを添加しない}) + 1$$
- オートクレーブした1.5 mLチューブにフィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製します。この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 µL) です。

14.8 µL	× N	オートクレーブ済蒸留水	
10 µL	× N	Amplification buffer	(AB: 透明キャップ)
10 µL	× N	DQB1 Primer Solution	(HLA- DQB1: 緑色キャップ)
10 µL	× N	MgCl ₂	(MgCl ₂ : 薄紫色キャップ)
0.2 µL	× N	LiPA-Taq	(LT: 紫色キャップ)
- 優しくルテックスにかけ、PCRチューブにマスターミックスを45 µLずつ分注します。
- 調製したGenomic DNA 5µL (0.05~0.1 µg) をピペットで添加します。必要ならば(例・PE-480を使用する場合)、各チューブにミネラルオイルを2滴 (≒40µL) ずつ添加します。陰性コントロールチューブに蒸留 (DNA無し) 5 µLを添加します。
- 合計50 µLのDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーへ入れます。

2.2 PCR反応条件

2.2.1 HLA- Class I amplification, DRB1, DRB1*03, 11, 13, 14の条件 (PE-9700)

	Step	Temp	Time	Cycle
1	Denature	96°C	5 min	
2	Denature	96°C	30 sec.	5 cycles
3	Anneal primers	64°C	50 sec.	
4	Extend primers	72°C	50 sec.	
5	Denature	96°C	30 sec.	5 cycles
6	Anneal primers	62°C	50 sec.	
7	Extend primers	72°C	50 sec.	
8	Denature	96°C	30 sec.	10 cycles
9	Anneal primers	60°C	50 sec.	
10	Extend primers	72°C	50 sec.	
11	Denature	96°C	30 sec.	15 cycles
12	Anneal primers	55°C	50 sec.	
13	Extend primers	72°C	50 sec.	
14	Elongate	72°C	10 min.	

* クラスIの反応条件は全て同一です。

2.2.2 DRB1, DRB decoder (DRB1+3+4+5, 86G, 86V) DQB1の条件 (PE-9700)

	Step	Temp	Time	Cycle
1	Denature	95°C	5 min	
2	Denature	95°C	20 sec.	35 cycles
3	Anneal primers	58°C	20 sec.	
4	Extend primers	72°C	20 sec.	
5	Elongate	72°C	10 min	

* DRB1、DRB decoder、DQB1の反応条件は同一です。

2.2.3 DPB の反応条件 (PE-9700)

	Step	Temp	Time	Cycle
1	Denature	96°C	5 min	
2	Denature	96°C	15 sec.	30 cycles
3	Anneal primers	55°C	20 sec.	
4	Extend primers	72°C	20 sec.	
5	Elongate	72°C	10 min	

増幅後のサンプルは直ちにテストを実施するか、または-15~-20°Cでサンプルを保存します。

注意：未反応の増幅用試薬と増幅したPCR産物は、一緒に保存しないで下さい。

2.2.4 増幅の確認

増幅産物の存在の有無を、2%アガロースゲル電気泳動により確認します。増幅産物10 μLをゲルにアプライし、下記のサイズに増幅産物のバンドが見られることを確認後次のステップに進みます。

- ◇ A578bp (exon1-2), 436bp (exon3), 377bp (exon4)
- ◇ B555bp (exon2), 436bp (exon3), 323bp (exon4)
- ◇ C904bp
- ◇ DRBおよびDRB1 decoder280bp
- ◇ DQB1261bp (exon2), 250bp (exon3)
- ◇ DPB280bp

注意事項

- 本製品は研究用試薬です。疾患の治療や診断の目的で使用することはできませんのでご注意ください。
- ロット番号の一致しないキットの試薬は混ぜないで下さい。
- 使用期限の切れた試薬は使用しないで下さい。
- キット試薬の物理的外観の変質は、試薬の不安定化や劣化を示しています。
- Amplification Buffer (AB)、各 Primer Solution と LiPA-Taq (LT)は、防腐剤としてアジ化ナトリウムを含んでいます。これらの溶液を飲み込むと有害です。非常に有害なガスの発生を防ぐため、酸と接触させないでください。配管中で爆発性の鉛アザイドや銅アザイドが形成されるのを防ぐため、アジ化ナトリウムを含む溶液を廃棄した後は水で配管をよく洗い流して下さい。
- サンプルは感染の可能性があるものとして取り扱って下さい。
- ヘパリン採血の全血サンプルは使用できません。
- DNA の混入を避けるため、増幅の前と後のステップでは、実験室、ピペットや用具、上着やグローブを分けて使用することをお勧めします。試薬は DNA の混入の原因となりうる物質、特に DNA 増幅産物からは隔離して保存して下さい。
- 増幅後の部屋から、増幅前の部屋に戻ることは避けて下さい。
- 増幅手順に使用する全てのピペットチップやチューブはオートクレーブ滅菌して下さい。フィルター付きのピペットチップの使用をお勧めします。
- 各分注毎に新しい滅菌ピペットチップを使用して下さい。
- 試薬バイアルを開ける前に軽くボルテックスにかけ、試薬をよく混ぜて下さい(特に LiPA-Taq)。使用後は直ちに全てのバイアルを閉じて下さい。
- 試薬への微生物のコンタミを避けて下さい。
- LiPA-Taq (LT)は $-15^{\circ}\text{C}\sim-20^{\circ}\text{C}$ に保存して下さい。
- オリジナルのバイアルのまま $-15^{\circ}\text{C}\sim-20^{\circ}\text{C}$ で保存した場合、試薬はキットの使用期限まで安定ですが、小分けして $-15^{\circ}\text{C}\sim-20^{\circ}\text{C}$ に保存する事をお勧めします。

株式会社ベリタス 〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL 03-3593-3211 FAX 03-3593-3216
技術的なお問い合わせは：TEL 03-3593-3385 E-mail techservice@veritastk.co.jp