



# KIR SSOによるタイピング

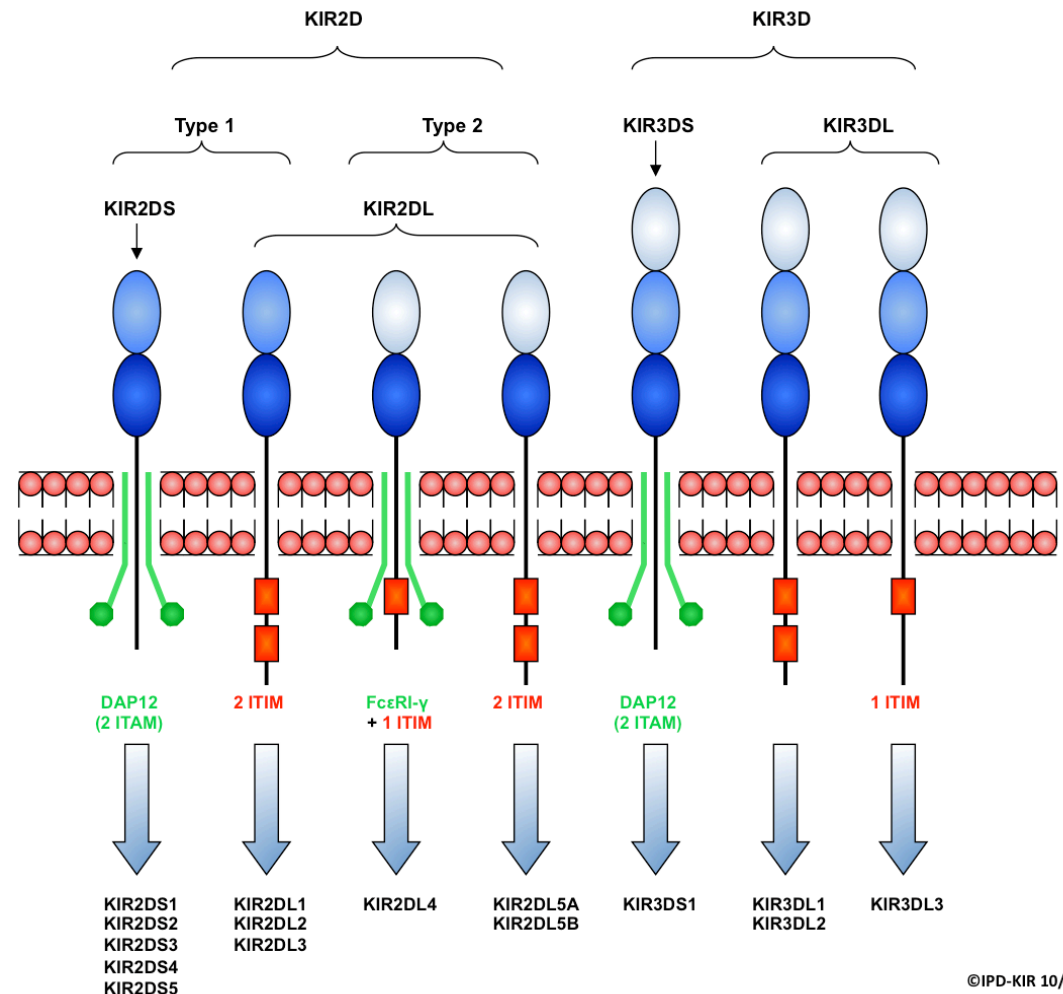
株式会社ベリタス  
技術推進部

# 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 | ?              |

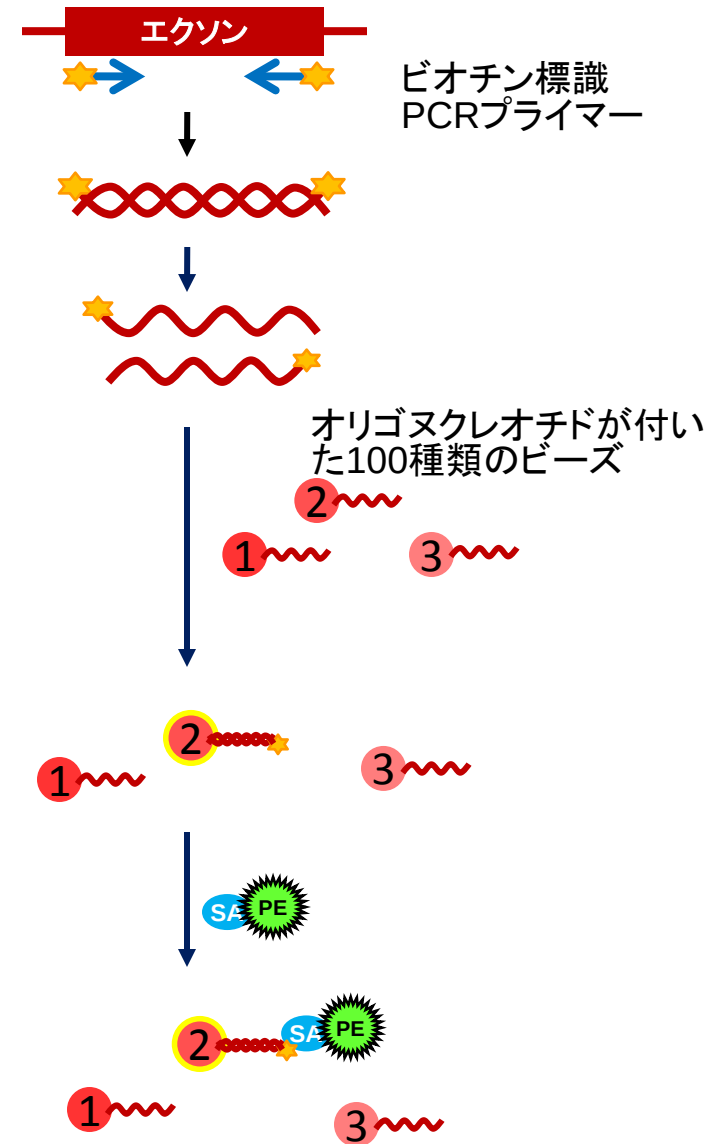
# KIRとHLAの対応表

| 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    | ※A*24:04,B*13:01,B*13:02,B*27:08は含まない |              |              |
|        |      | B77    |                                       |              |              |

# KIR SSOの原理

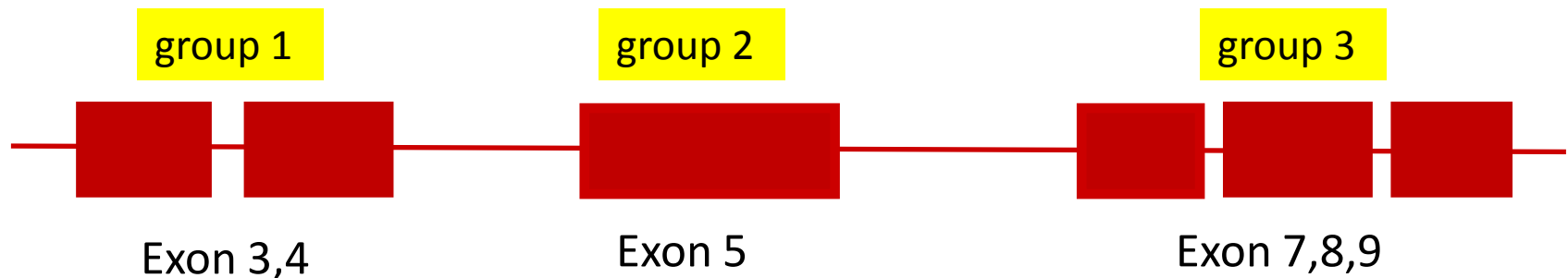
- PCR-rSSO法を利用

- 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<sup>®</sup>キット内容



| 使用段階               | 試薬名                   | 注意点                                  |
|--------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| PCR前<br>[PRE PCR]  | Primer Mix (Group1-3) | 冷凍(−20℃保存)                           |
|                    | D-Mix                 | 冷凍(−20℃保存)、紫色                        |
| PCR後<br>[POST PCR] | Beads Mix (Group1-3)  | 開封後は冷蔵・遮光保存<br>再凍結厳禁!<br>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/<br>ベリタス       | LT-SAPE  | <ul style="list-style-type: none"><li>✓ 2000検体分</li><li>✓ プローブの蛍光標識</li><li>✓ 滅菌水で希釈後は、遮光で冷蔵保存</li></ul>                                    |
| Ampli <i>Taq</i> DNA polymerase<br> | ABI/<br>Life Technologies | N8080160 | <ul style="list-style-type: none"><li>✓ メーカー指定</li><li>✓ Ampli<i>Taq</i> “Gold” は使用不可</li><li>✓ 他社製品の<i>Taq</i> DNA polymeraseも不可</li></ul> |

# 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<br>GeneAmp PCR 9700 /又は<br>veriti | ABI/<br>Life Technologies |          | 参考商品<br>アルミヘッド不可 |
| 高速遠心機<br>(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<br>(Luminex)                     | One Lambda/<br>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/μL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/ $\mu$ L)

2.0  $\mu$ L

各ローカスのPrimer mix

4.0  $\mu$ L

D-mix

13.8  $\mu$ L

Ampli*Taq* DNA Polymerase

0.2  $\mu$ L

---

Total (1テストあたり)

20.0  $\mu$ L

プレミックス溶液

調整量は、サンプル数 + 1,2検体余分に調整して下さい。

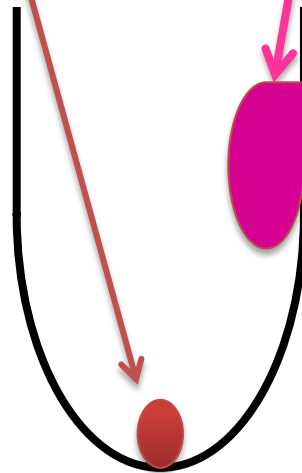
# プレミックス分注方法

(1) DNA溶液 2.0  $\mu\text{L}$   
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  $\mu\text{L}$

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

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

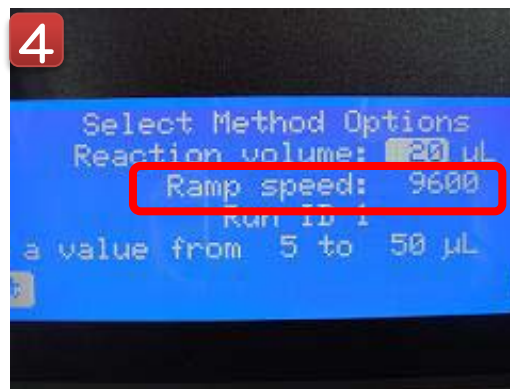
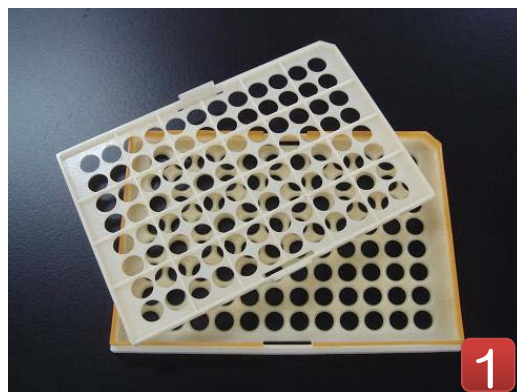
→ DNA 1, 2, 3, 4, ...

|                  |                  |                  |  |
|------------------|------------------|------------------|--|
| DNA 1<br>Group 1 | DNA 1<br>Group 2 | DNA 1<br>Group 3 |  |
| DNA 2<br>Group 1 | DNA 2<br>Group 2 | DNA 2<br>Group 3 |  |
| DNA 3<br>Group 1 | DNA 3<br>Group 2 | DNA 3<br>Group 3 |  |
| DNA 4<br>Group 1 | DNA 4<br>Group 2 | DNA 4<br>Group 3 |  |
| ...              | ...              | ...              |  |
|                  |                  |                  |  |
|                  |                  |                  |  |

32検体以上の場合は、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℃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     |

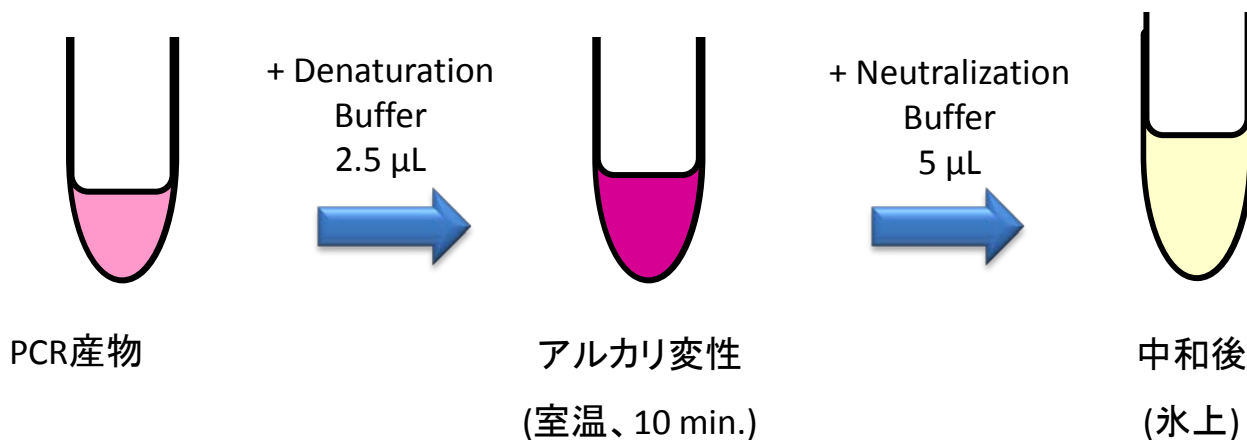
# PCR後の準備

- 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 $\mu$ L |
|------------|-------------|

|                      |              |
|----------------------|--------------|
| Hybridization Buffer | 34.0 $\mu$ L |
|----------------------|--------------|

---

|                 |              |
|-----------------|--------------|
| total (1テストあたり) | 38.0 $\mu$ L |
|-----------------|--------------|

# Beads mix溶液分注時の注意

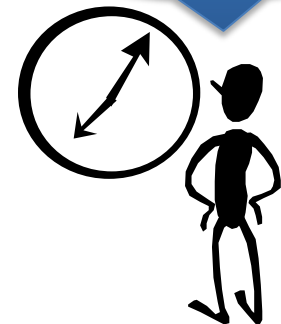
- 氷上で分注する
- グループ毎にBeads mixは異なるので、試薬の入れ間違いに注意する
- ウェル間のコンタミを防ぐため、しっかりとシールを貼る。

### 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



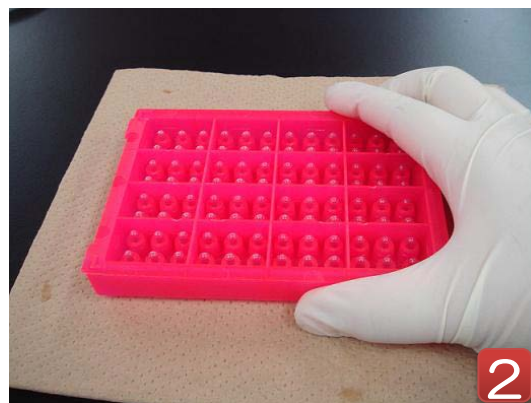


# 洗浄操作の準備

- 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  $2000 \times g$ 、2分間、または $1500 \times g$ 、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 $\mu$ L |
|-----------|-------------|

|             |              |
|-------------|--------------|
| SAPE Buffer | 49.5 $\mu$ L |
|-------------|--------------|

---

|                 |              |
|-----------------|--------------|
| total (1テストあたり) | 50.0 $\mu$ L |
|-----------------|--------------|

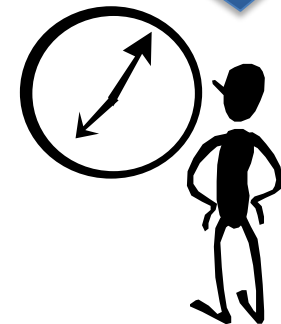
※ 検体数 + 2-3検体分余裕をもって作成します。全検体共通です。

## ④標識 (ラベリング)

- サーマルサイ클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)

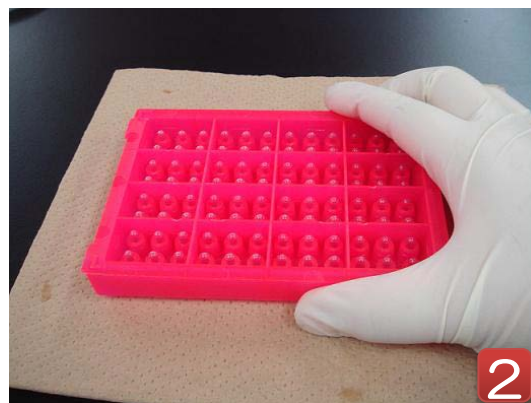


正確に  
5 minutes !!



# 洗浄操作(1回)

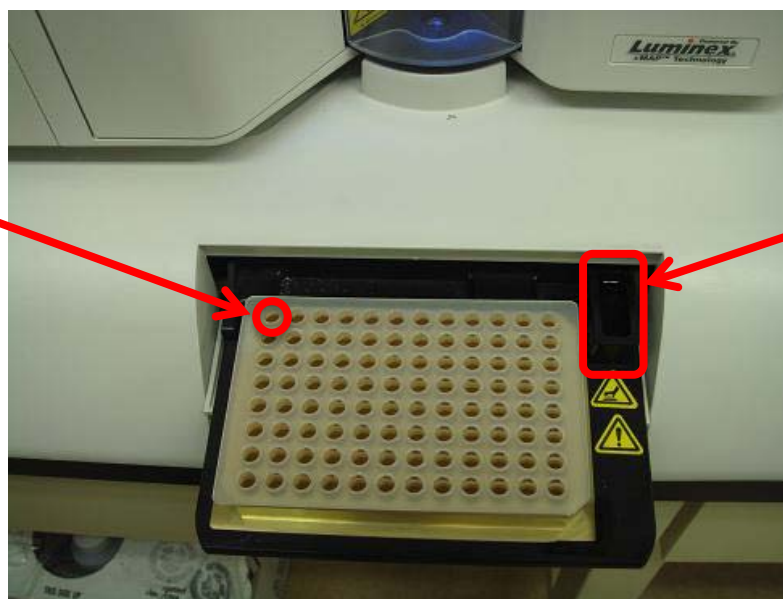
- ① Washing bufferを100ul添加し、シールを貼る
- ②  $2000 \times g$ 、2分間、または $1500 \times g$ 、3分間で遠心
- ③ フリッキングにより上清を除去
- ④ キムタオルで5秒間押しつけ、軽く5回タッピングする
- ⑤ ビーズのみの状態でボルテックス(ドライボルテックス)



## 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ッティング

A01のウェル

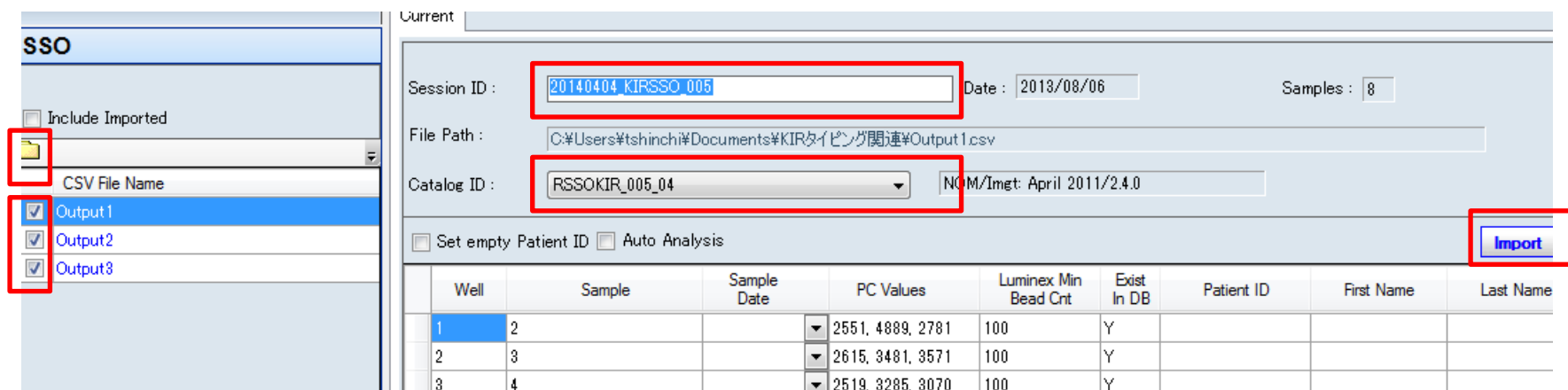


Reservoir Box  
シース液を添加

# 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



| 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

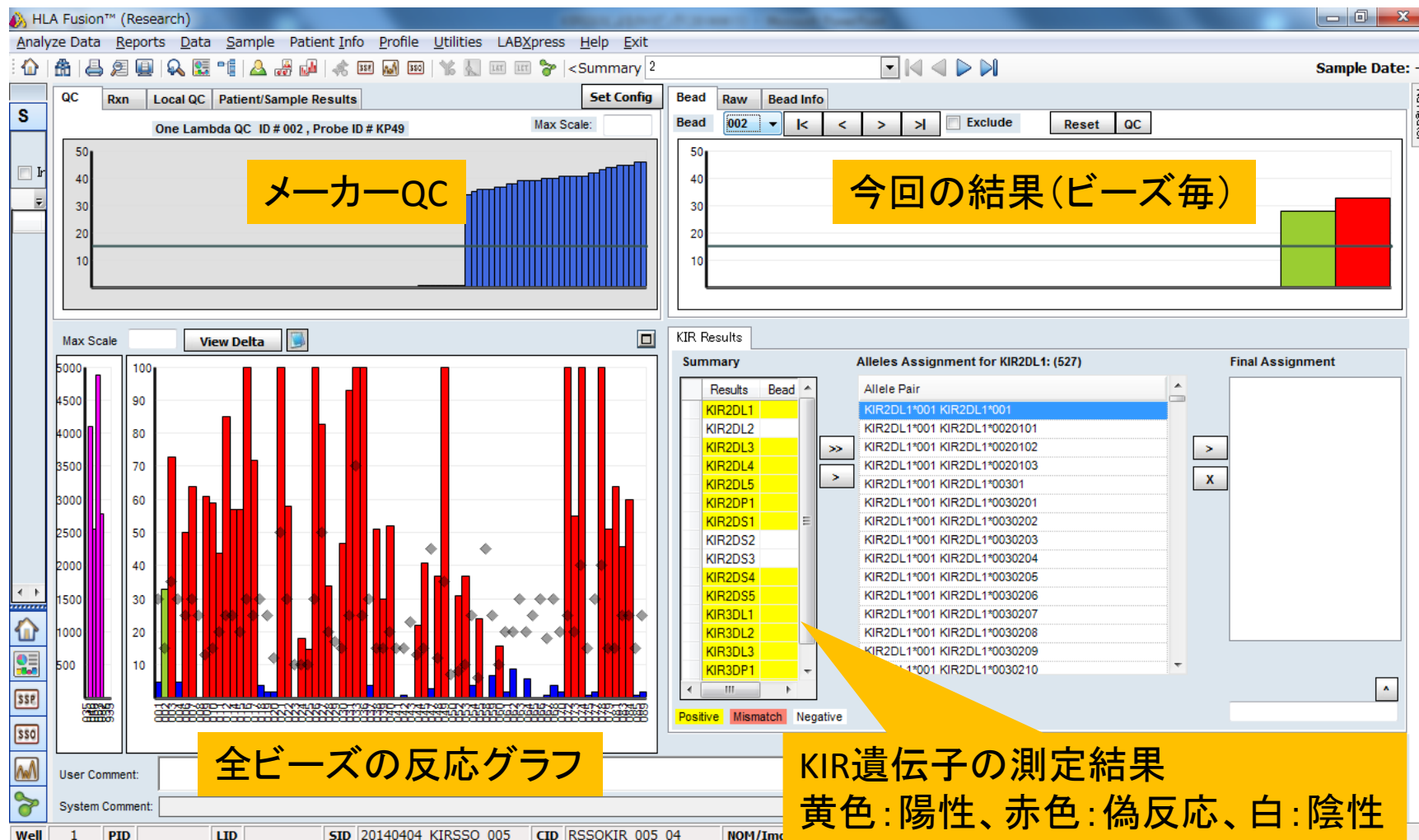
Preview

Session : 20140404\_KIRSSO\_005 Catalog : RSSOKIR\_005\_04 NOM: April 2011 - 2.4.0 Number of Sample(s): 8

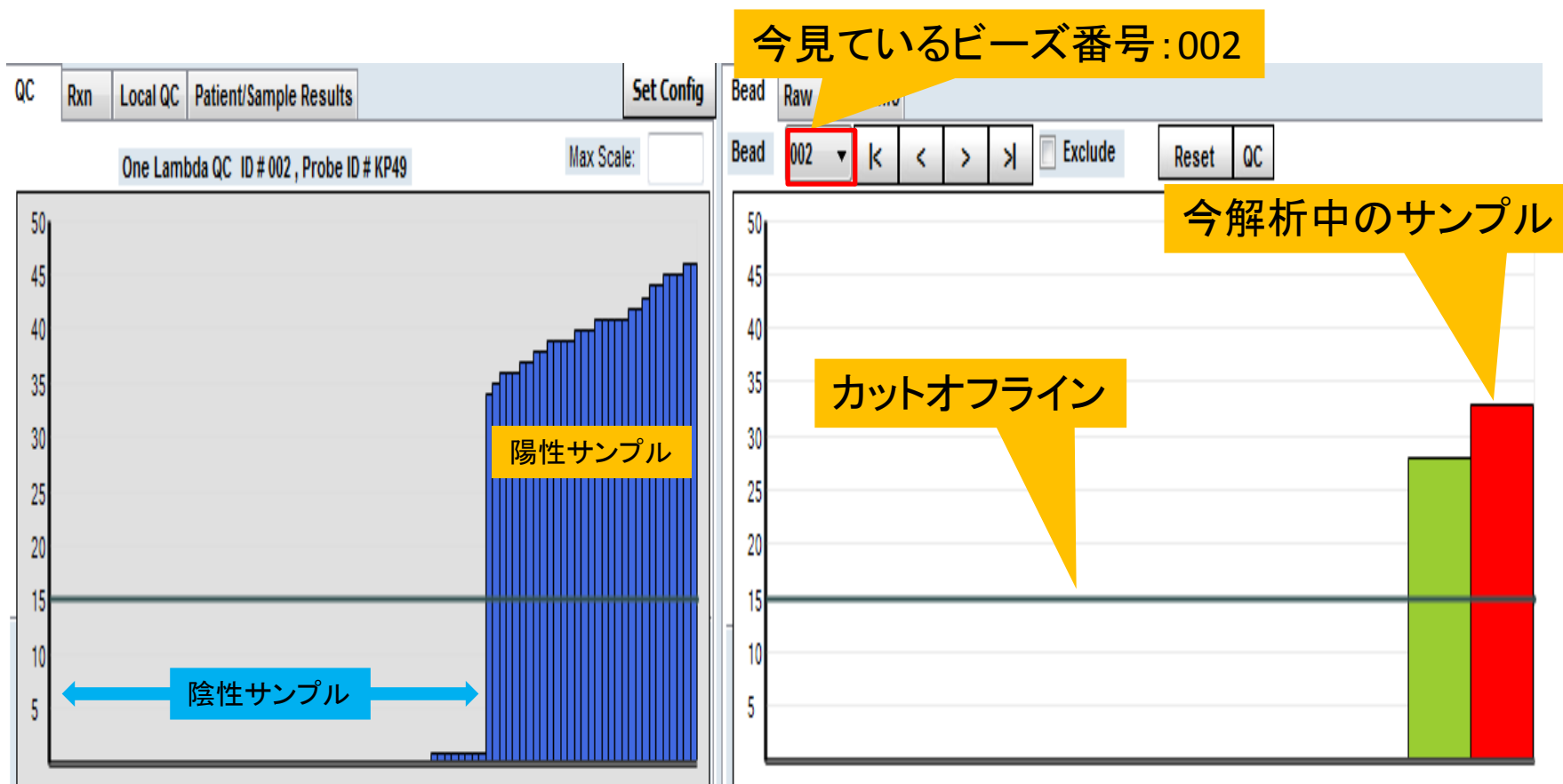
| Sample | More Test                | KIR2DL1 | Assign 2DL1 | KIR2DL2 | Assign 2DL2 | KIR2DL3 | Assign 2DL3 | KIR2DL4 | Assign 2DL4 | KIR2DL5 | Assign 2DL5 | KIR2DP1 | Assign 2DP1 | KIR2DS1 | Assign 2DS1 | KIR2DS2 | Assign 2DS2 | KIR2DS3 | Assign 2DS3 |
|--------|--------------------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|
| 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

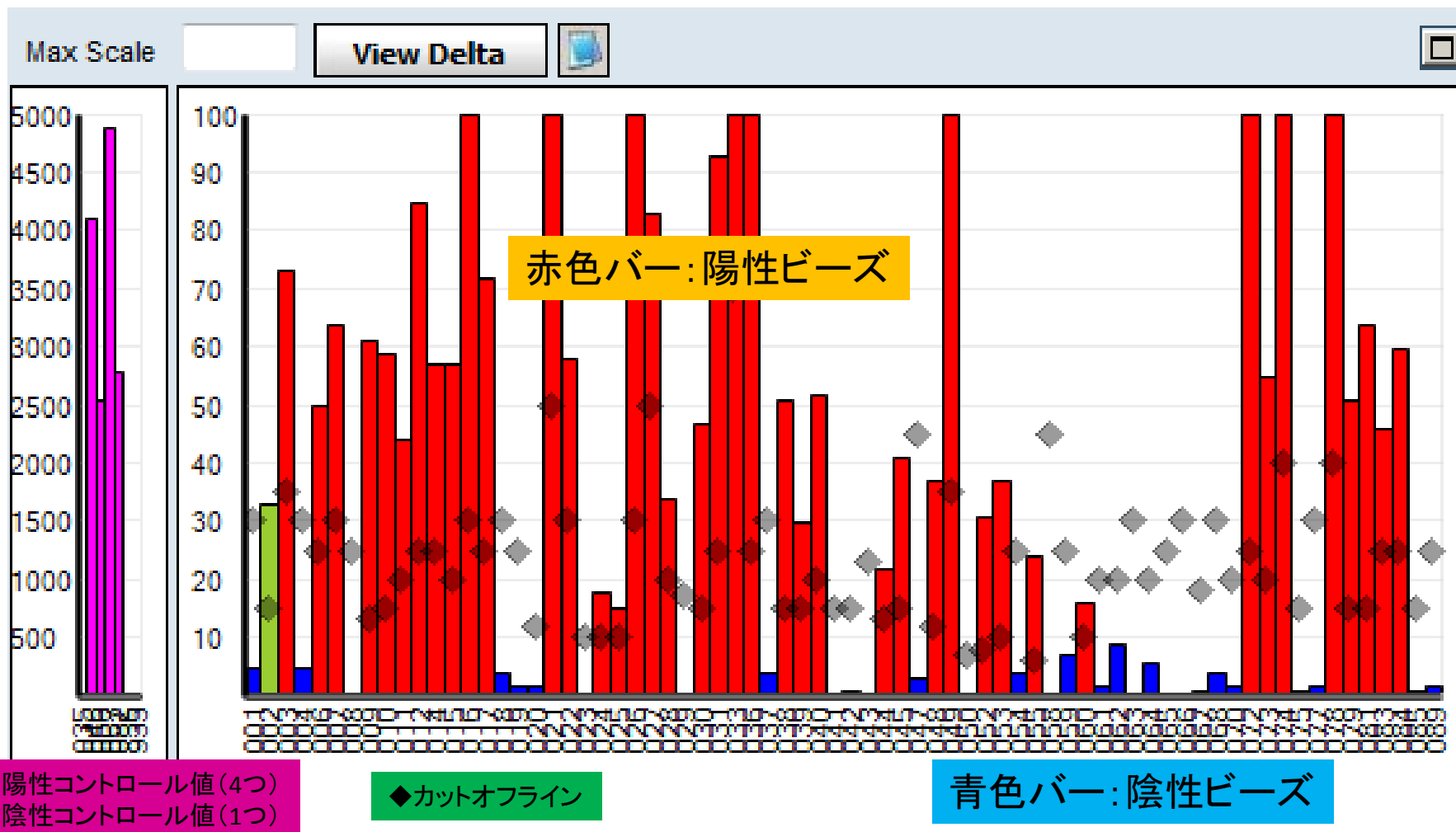


# メーカーQCと今回の結果の比較



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 |      |

Positive Mismatch Negative

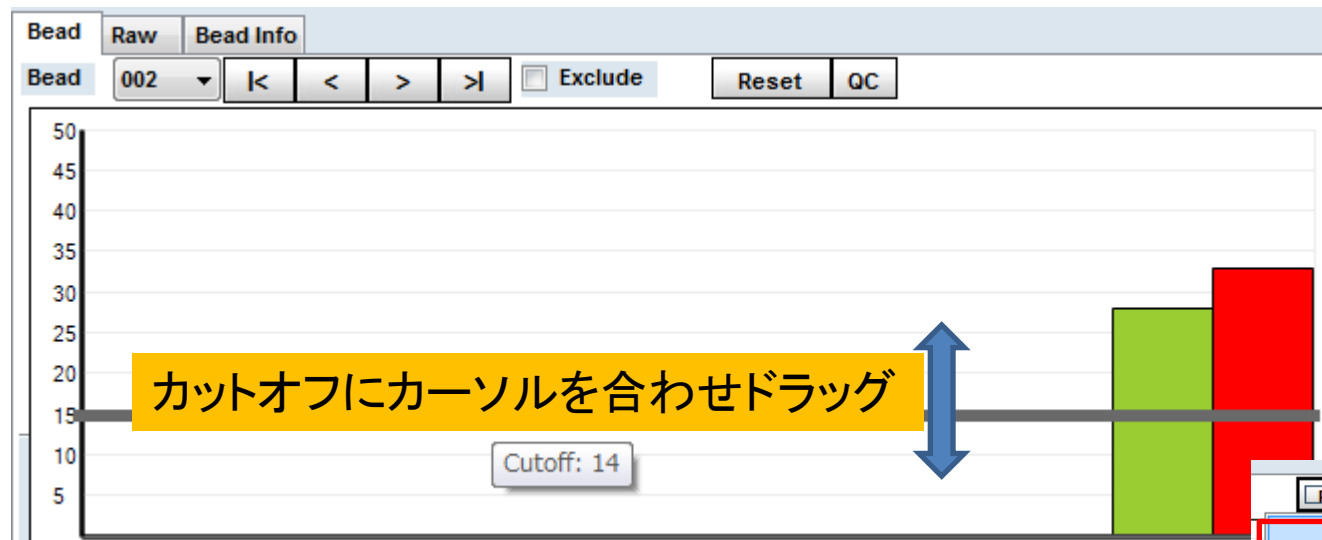
Alleles Assignment for KIR2DL1: (527)

| 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 |

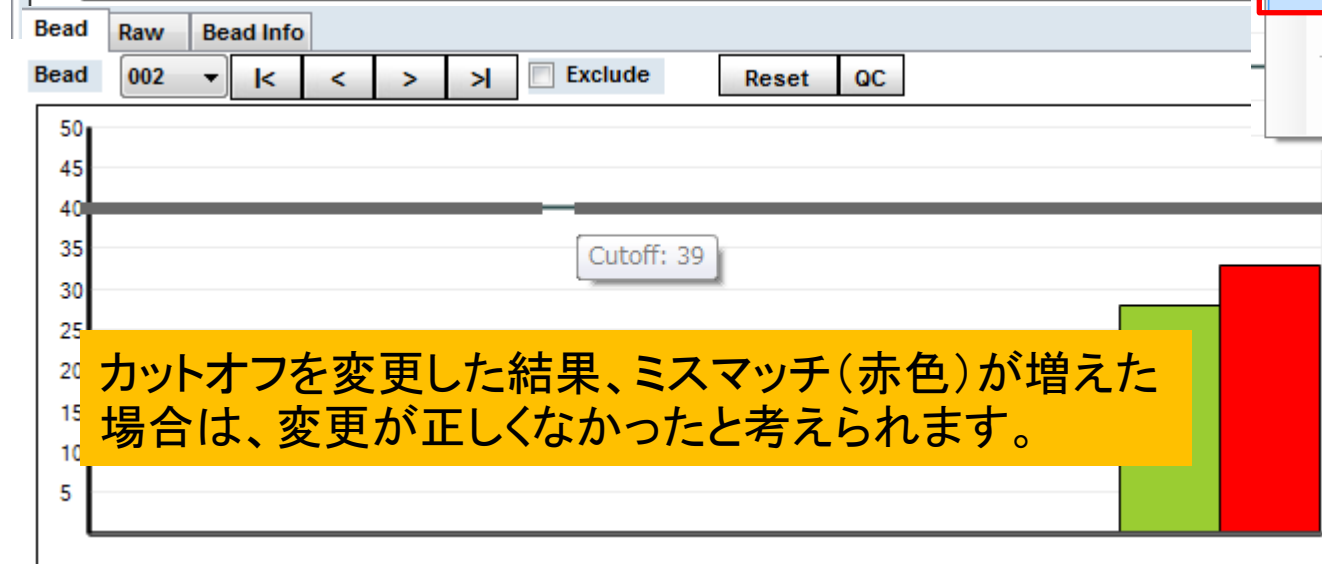
Final Assignment

|         |
|---------|
| KIR2DL1 |
| KIR2DL3 |
| KIR2DL4 |
| KIR2DL5 |
| KIR2DP1 |
| KIR2DS1 |
| KIR2DS4 |
| KIR2DS5 |
| KIR3DL1 |
| KIR3DL2 |
| KIR3DL3 |

# カットオフの変更の仕方



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



Reset QC

Current Sample : Current Bead to OLI Default

Current Sample : All Beads to OLI Default

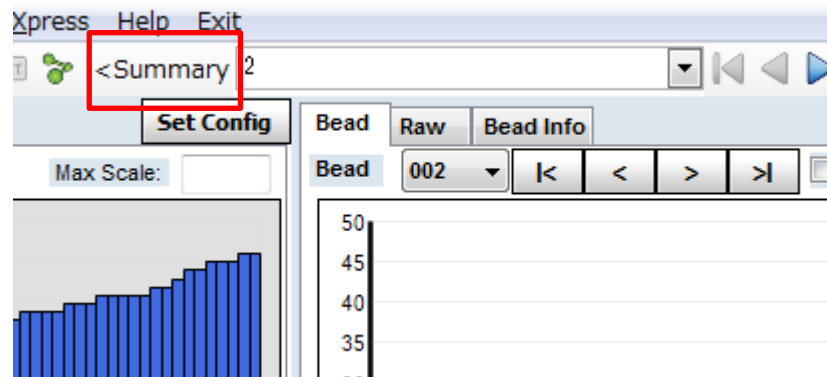
Current Sample : All Beads to User Setting

**変更をリセット可能**

| Results | Bead   |
|---------|--------|
| KIR2DL1 |        |
| KIR2DL2 |        |
| KIR2DL3 |        |
| KIR2DL4 |        |
| KIR2DL5 | 001.00 |
| KIR2DP1 |        |
| KIR2DS1 |        |
| KIR2DS2 |        |
| KIR2DS3 |        |
| KIR2DS4 |        |
| KIR2DS5 |        |

# 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<br>2DL1 | KIR2DL2 | Assign<br>2DL2 | KIR2DL3 | Assign<br>2DL3 | KIR2DL4 | Assign<br>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)

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

Cooley et al Blood 2010

# 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 |     |     |
|           | Cen-A1 |      |      |      |      |       |        |      |      |      |    |      |      |      |       |        |      |      |      | Tel-B1 |     |     |
|           | Cen-B1 |      |      |      |      |       |        |      |      |      |    |      |      |      |       |        |      |      |      | Tel-A1 |     |     |
|           | Cen-B2 |      |      |      |      |       |        |      |      |      |    |      |      |      |       |        |      |      |      | Tel-A1 |     |     |
|           | Cen-B1 |      |      |      |      |       |        |      |      |      |    |      |      |      |       |        |      |      |      | Tel-B1 |     |     |
|           | Cen-B2 |      |      |      |      |       |        |      |      |      |    |      |      |      |       |        |      |      |      | 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？

| Summary | Control Value | Bead Analysis |
|---------|---------------|---------------|
| Match M |               |               |
| Match S |               |               |
| False   |               |               |
| Miss    |               |               |

| 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っていませんでした。
    - 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-ss0&c4=2&c5=16&c6=54>



Home | About Us | News & Events | Distributors | Resources | Support



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います。
  - 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℃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ことがあります。



# 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