



LABType

LABScan100を使った、
ハイスループットなHLAタイピング試薬

株式会社ベリタス
(2012年6月)

HLAタイピング法

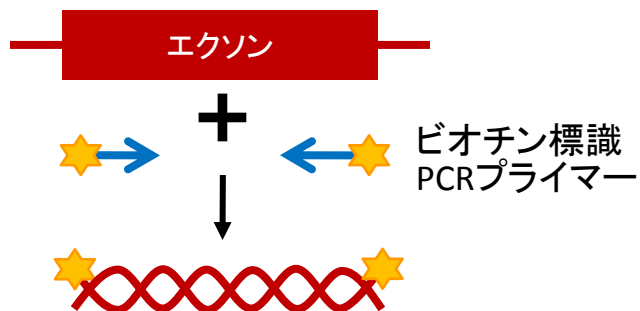
方法	製品名	検体処理数	時間	DNA	解像度	必要な機器
SSP	マイクロ SSP	△	◎	△	○ または ◎	ゲル泳動槽
SSO	LABType SSO	◎	○	◎	○	LABScan 100 / Luminex
	LABType HD	◎	○	◎	◎	LABScan 100 / Luminex
SBT (参考)		○	△	○	◎	シーケンサー

LABType とは

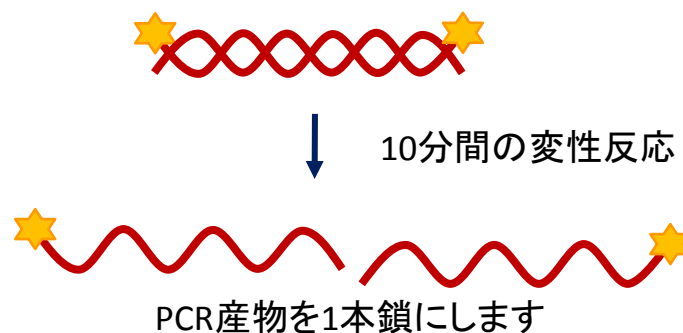
- PCR-rSSO法による、ハイスループットなHLA DNA タイピングキット
- 特に多型が多いエクソン2、エクソン3 (クラスIのみ) 領域をタイピング
- 補足試薬としてエクソン4ーエクソン7の領域をタイピングする試薬がある
- アメリカ骨髄バンク(NMDP)で採用
- 日本人のみならず、
全ての人種・民族に対応した世界
- 標準キット
 - 混血、日本人レアアリのタイピングも問題なし

LABType の原理

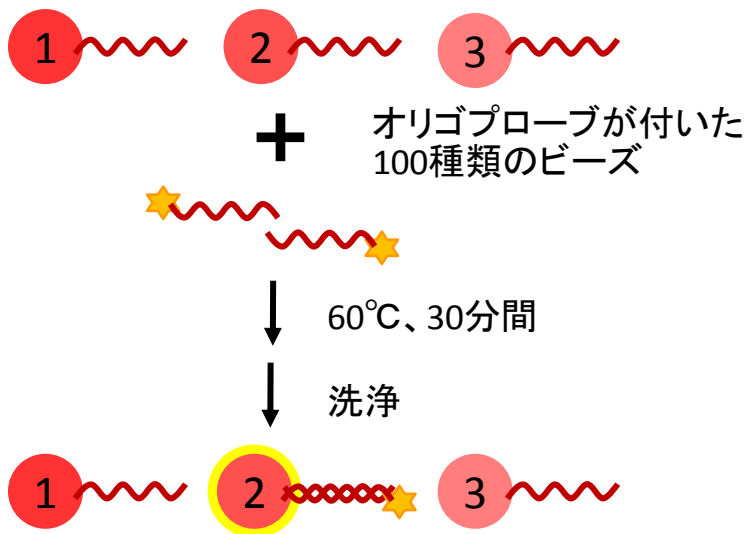
1. PCR増幅



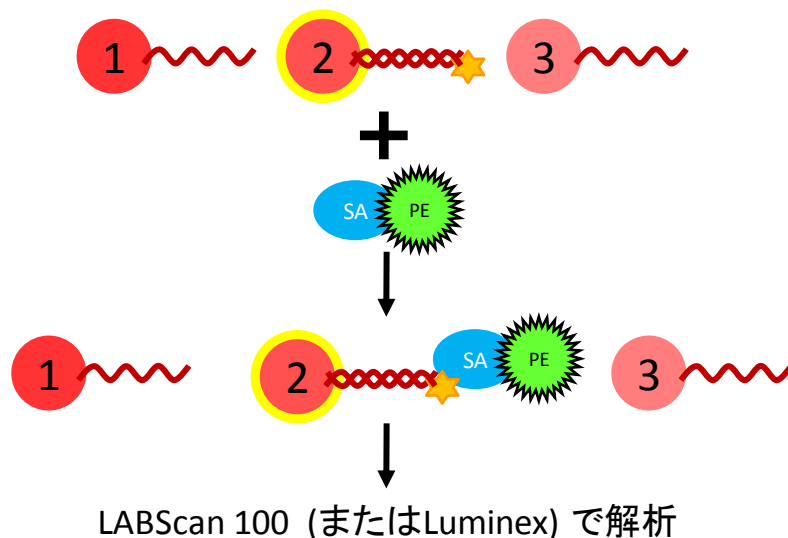
2. アルカリ変性 / 中和



3. ハイブリダイゼーション



4. 標識～検出



LABType と LABType HD

	LABType SSO	LABType HD
解像度	中解像度	高解像度
特長	<ul style="list-style-type: none">• 中解像度なハイスループット HLA-DNAタイピングキット• 製品ラインナップが豊富	<ul style="list-style-type: none">• より多くのプローブを用いた HLA-DNAタイピングを実現• 特殊な解析システムを採用
HLAクラスI	<ul style="list-style-type: none">• HLA-A• HLA-B• HLA-C• Class I Exon 4-7 (A, B, C)	<ul style="list-style-type: none">• HLA-A• HLA-B• HLA-C
HLA クラスII	<ul style="list-style-type: none">• HLA-DRB1• HLA-DQA1/DQB1• HLA-DPA1/DPB1• HLA-DR3, 4, 5	<ul style="list-style-type: none">• HLA-DRB1

操作方法は全製品共通


LABType キット内容



使用段階	試薬名	注意点
PCR前 [PRE PCR]	Primer Mix (ローカス毎)	冷凍(−20℃以下で保存)
	D-Mix	冷凍保存 黄色に変色した溶液は不可
PCR後 [POST PCR]	各ローカスのBeads Mix	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
	Denaturation Buffer	強アルカリ性、取扱注意
	Neutralization Buffer	常温保存
	Hybridization Buffer	常温保存
	Washing Buffer	常温保存
	SAPE Buffer	冷蔵(2−8℃)保存

LABType 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

LABType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		メーカー指定 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	

LABType SSO 操作手順

PCR (約1.5 時間)



アルカリ変性 (RT、10min.)



ハイブリダイゼーション (60°C、15min.)



洗淨 (100 μ L \times 3) & ドライボルテックス*

ストレプトアビジン-PE標識 (60°C、5min.)



洗淨 (100 μ L \times 1) & ドライボルテックス*

LABScan 100 またはLuminexでデータ読取

※ドライボルテックス ... 上清を除去後、ビーズだけの状態でボルテックス

KIR SSO Typing Kit

- ハイstrupットな、PCR-rSSO法によるDNAタイピング試薬
- LABScan100でデータ読取
- エクソン3、エクソン5、エクソン7-9の3領域からKIR DNAアレルを決定
- 判定可能なKIRのタイプ
(右表)

2DL1	2DS1	3DL1
2DL2	2DS2	3DL2
2DL3	2DS3	3DL3
2DL4	2DS4	3DS1
2DL5	2DS5	3DP1
		3DP2

KIR SSO Typing Kit 操作手順

KIR遺伝子のエクソン3, 5, 7-9をカバーする3グループを別々にPCR増幅



PCR産物を1本鎖に変性



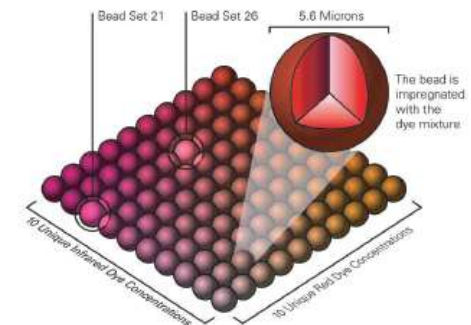
KIRアリル特異的配列をもつプローブ(ビーズ)とハイブリダイゼーション反応



各プローブの特異性と反応パターンからアリルを判定

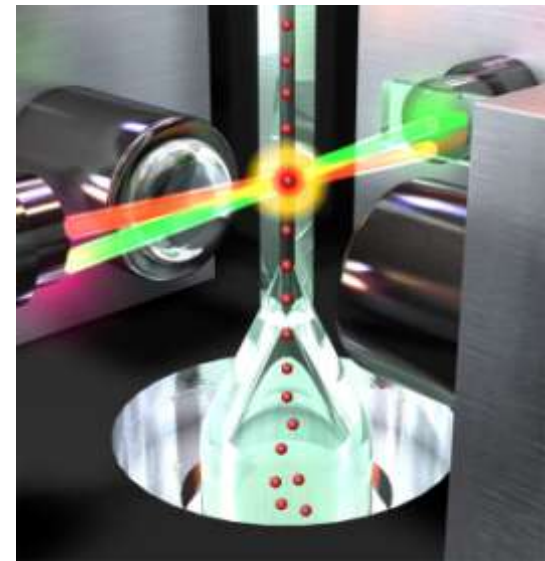
LABScanに使われるビーズの特徴

- 直径5.6 μm のポリスチレン製
- xMAPテクノロジーに基づいたビーズ構成
 - 100色(2色の蛍光色素を10段階で混合)で色づけされた100種類のビーズ
 - 各色のビーズに番号を割り当て
- ビーズ表面にオリゴヌクレオチドやタンパクがコーティング
 - LABType: オリゴヌクレオチド
 - LABScreen: 精製HLA抗原



LABScan100 (Luminex) とは

- 赤、緑の2色のレーザーを搭載
 - 赤色: ビーズの番号を識別、カウント
 - 緑色: PE 蛍光強度の測定



LABScan100を使用するメリット

- ハイスループット
 - 1ウェルで1テスト、96ウェルで最大96テスト
- 1台の機器でHLA抗原・抗体タイピング・サイトカイン測定いずれも解析
- 各キットの洗浄、標識などの基本操作が共通
- 専用解析ソフト(HLA Fusion2.0)により、解析結果の一元管理が可能