



# マイクロSSP

PCR-SSP法による  
HLA-DNAタイピング試薬

# One Lambda社について



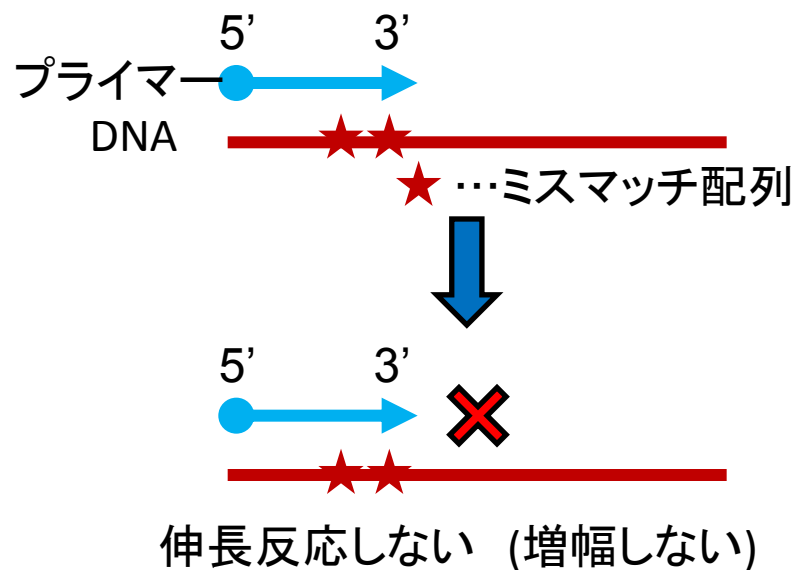
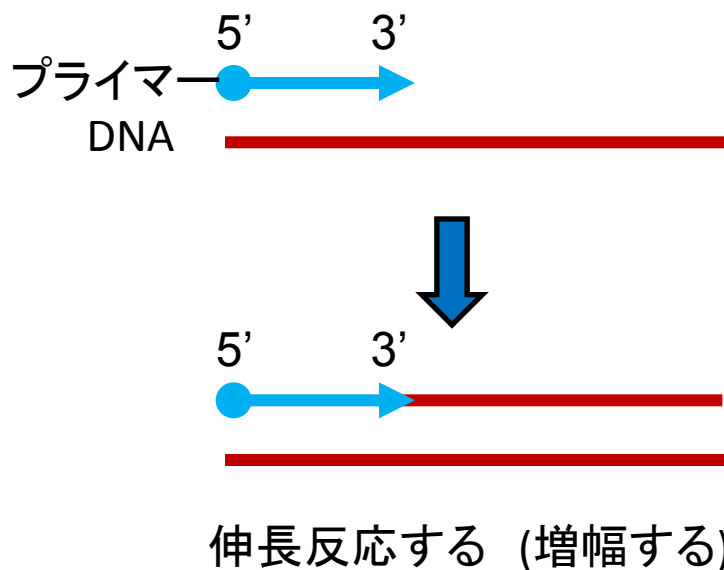
- 1984年創設
- 本社： アメリカ・カリフォルニア州
- 高品質で最先端のHLAタイピング・移植関連試薬を製造
- 高い研究開発力
- 日本人集団だけでなく、すべての人種に対応した試薬を供給

# 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

# PCR-SSP(Sequence Specific Primer)法

- ある特定の配列をもったDNA部位だけをPCRで増幅
- PCRプライマーの3'-末端に特異な配列を設定
- 各プライマーの「増幅」の有無から、アリルを判定



# マイクロSSP

- PCR-SSP法によるHLAタイピングキット
- 操作が簡便（解析まで約2時間）



# マイクロSSPキットの構成

- 96ウェルトレイ
  - 各ウェルに凍結乾燥したプライマーが分注済み
  - キットによりトレイのウェル数が異なる
- D-mix
- トレーシール

# キットに含まれない必要試薬



商品名	メーカー	カタログ番号
Ampli $Taq$ DNA ポリメラーゼ	ABI (Life Technologies)	N8081060
SeaKem LE Agarose	タカラバイオ (FMC Bioproducts)	50000, 50001, 50004, 50005
エチジウムブロマイド	メーカー問わず	
ベリタスサイズマーカー	ベリタス	IBL-MK
TBE	メーカー問わず	

# マイクロSSPに必要な器具・機器類



商品名	メーカー	カタログ番号
GeneAmp PCR System 9700 またはVeriti (アルミヘッドは不可)	Applied Biosystems (Life Technologies)	
マイクロSSP PCR用パッド PE9700用	One Lambda / ベリタス	SSPPADTN
マイクロSSP用泳動槽	One Lambda / ベリタス	MGS108
マイクロピペッター		
マルチチャンネルピペッター		
ボルテックスミキサー		
パワーサプライ		
電子レンジ (ゲル作成用)		
UVトランスイルミネーター		
ゲル撮影装置		



# マイクロSSP操作の流れ

---

1. DNA抽出
2. PCRサンプル調製
3. PCR増幅
4. アガロースゲル電気泳動
5. 判定

- 採血の条件
  - ACD加血を推奨
  - ヘパリン加血は不可 (Taq DNAポリメラーゼの活性化を阻害する危険があるため、PCR増幅不良を起こす)
- DNA検体は滅菌水で希釈
- DNA濃度: 100 ng/uLで使用  
(50 ng/uL以下は増幅が弱くなる傾向)
- DNA純度 (A260/A280): 1.6~1.8

# PCRサンプルの調製

- タイピングトレイと試薬を室温に戻す
- 調製前にDNA検体、D-Mixはボルテックスで混和
  - 黄色に変色したD-Mixは使用不可
  - *Taq* DNAポリメラーゼは、*AmpliTaq* DNAポリメラーゼ (Life Technologies)を使用
- D-Mixの入ったチューブにDNA検体、*Taq* DNAポリメラーゼを入れ、ボルテックスで混和
- DNAと*Taq* DNAポリメラーゼを添加したD-Mixをウェルに分注
- 確実にシールを貼る

- PCR条件はマイクロSSP製品すべて共通
- PCR時はMicro Ampトレーを使用
- PCRプレートの上にPCR用パッドを必ず載せる
- Gene Amp 9700・Veritiサーマルサイクラーの使用の場合、Ramp speedが「9600」モードになっているかを確認

# アガロースゲル作製

SeaKem LEアガロース                    0.75 g

1 × TBE                                        35 mL



電子レンジでゲルの粒子が見えなくなるまで溶解

+ 10 mg/mL エチジウムブロマイド                    2  $\mu$ L



よく混合したら専用ゲルボックスに流し込み、コームをはめる (泡を入れないように注意)

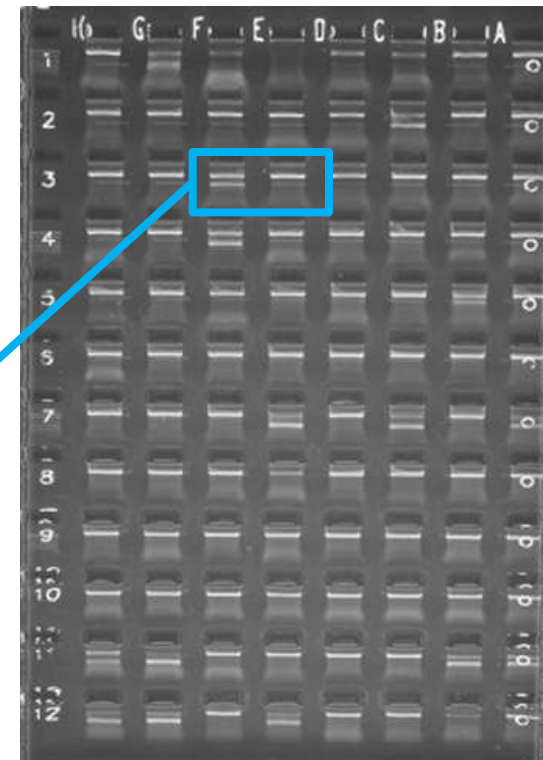
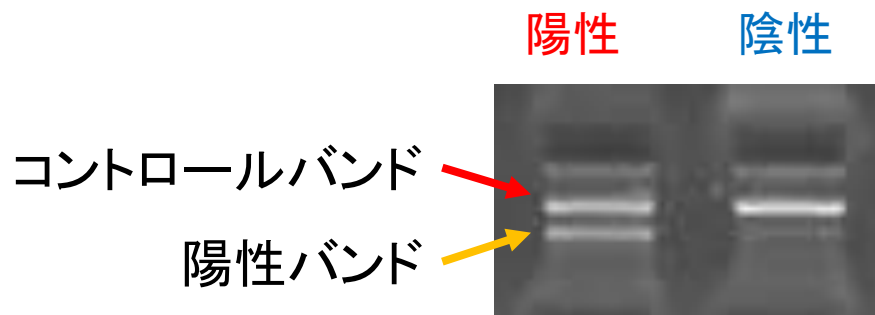


ゲルが完全に固まるまで室温で静置

1 × TBE (約15 mL)を専用ボックスを満たし、  
慎重にコームを外す

# アガロースゲル電気泳動による判定

- 150V定電圧で泳動
- ピンク色のマーカーがウェルの半分程度まで到達したら、泳動を終える(約3分)
- UVランプ上で写真撮影
- 陽性・陰性の判定へ



# マイクロSSPのデータ解析

- 解析ソフトウェア(HLA Fusion 2.0) を使用
  - 自動解析
  - Ambiguityの表示
  - 集団のアリル頻度によるソーティングも可能
- ワークシートの使用

# HLA Fusion 2.0の特長

- 半年に1度nomenclatureのデータベース更新を行うため、常に新しいアレル情報で解析
- 抗原タイピング、抗体検査のデータ解析を同一のソフトウェアで解析可能
- 製品のロット変更に対応
- 「アレルフィルター」を使用して、日本人の頻度に応じて結果のソーティング（並び替え）が可能



# HLA Fusion 2.0の解析画面

HLA Fusion™

Analyze Data Reports Data Sample Patient Info Profile Utilities Help Exit

Sample ID: Veritest 2010/07/27 Clear DQB1\*03:02 Find Allele # False Run 1 Force 1 Run Reset

	H	G	F	E	D	C	B	A
01	1	1	1	1	8	1	1	8
02	1	1	1	1	1	1	1	8
03	8	1	1	1	1	1	8	8
04	8	8	8	1	1	8	1	1
05	1	1	1	1	1	1	1	8
06	1	1	1	1	1	1	1	1
07	1	1	1	1	1	8	8	1
08	1	1	8	8	8	1	1	1
09	1	8	8	8	1	1	8	1
10	1	8	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	8	1	8
12	1	1	8	1	1	8	1	1

Run

	5	8	16	17	23	24	25	26	27	30	40	54	55	59
Cross Loci														
Sample Run	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
A*11:01:01		X												
A*11:01:02		X												
A*11:01:03		X												
A*11:01:04		X												
A*11:01:05		X												
A*11:01:06		X												
A*11:01:07		X												

Pair Match

Group 1: frequent on both

- A\*11:01:01 A\*24:02:01:01(G)
- A\*11:01:01 A\*24:04(G1)
- A\*11:01:01 A\*24:08(G1)
- A\*11:01:01 A\*24:20(G1)
- A\*11:02:01 A\*24:02:01:01(G)
- A\*11:02:01 A\*24:04(G1)

Possible Allele Code

AER:\*=02/03/04/05

DQB1\*03:XX1 DQB1\*06:XX1:\*=03:02/03:05/03  
XX2:\*=06:01/06:02/06

Possible Serology

DR- DR51"Blank"  
DQ8 DQ6  
DQ8 DQ-

Assigned Allele Pairs

Assigned Allele Code

A\*11:XX1 A\*24:XX2  
B\*15:XX1 B\*52:XX2  
C\*03:XX1 C\*04:XX2

Assigned Serology

A11 A24  
B62 B52  
Cw4 C-  
DR4 DR15

View Gel Add New Sample Analyze Combined Reanalyze

Comment Possible Homozygous Ambiguous...Possible Cross Locus Assign>> Save>> Confirm>>

Well 1 PID LID SID Micro SSP; CID SSPJPN NOM/Img# January 2010 Test Date 2010/07/27 Ver 2.0.0

# マイクロSSP レポート出力画面例



## MSSP Veritas Techsupport

Patient ID:	Name:		
Sample ID: Veritest	Local ID:		
<b>Assigned Allele Pairs:</b>	A*11:01:01 A*24:02:01:01	A*11:01:01 A*24:04	A*11:01:01 A*24:08
	A*11:01:01 A*24:20	A*11:02:01 A*24:02:01:01	A*11:02:01 A*24:04
	A*11:02:01 A*24:08	A*11:02:01 A*24:20	B*15:01:01:01 B*52:01:01
	B*15:07 B*52:01:01	B*15:27:01 B*52:01:01	B*15:28 B*52:01:01
	C*04:01:01:01 C*14:03	DQB1*03:02:01 DQB1*06:01:01	DRB1*04:05:01 DRB1*15:02:01
	DRB1*04:06:01 DRB1*15:02:01	DRB1*04:10 DRB1*15:02:01	DRB4*01:02 DRB5*02:02
	DRB4*01:03:01:01 DRB5*01:01:01	DRB4*01:03:01:01 DRB5*01:02	DRB4*01:03:01:01 DRB5*02:02

	H	G	F	E	D	C	B	A
1	1	1	1	1	8	1	1	8
2	1	1	1	1	1	1	1	8
3	8	1	1	1	1	1	8	8
4	8	8	8	1	1	8	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	8
6	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	8	8	1
8	1	1	8	8	8	1	1	1
9	1	8	8	8	1	1	8	1
10	1	8	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	8	1	8
12	1	1	8	1	1	8	1	1

- レポート内容はカスタマイズ可能
- レポートはPDF形式などでエクスポート可能

# マイクロSSP 製品紹介

- Genericトレー
- High Resolution トレー



- Allele Specificトレー



# マイクロSSP Genericトレー



- 用途: 抗原レベルのタイピング (低解像度のDNAタイピング)
- 製品例: クラスI タイピング用

商品コード	製品名	梱包単位
SSP1L	マイクロSSP クラスI Generic Typing Kit	12 tests
SSP1A	マイクロSSP HLA A Typing Kit	12 tests

- クラスII タイピング用

商品コード	製品名	梱包単位
SSP2L	マイクロSSP クラスII Generic Typing Kit (DRB/DQB)	30 tests
SSP2LB	マイクロSSP クラスII DRB Only Generic Typing Kit	12 tests

- クラスI & クラスII タイピング用

商品コード	製品名	梱包単位
SSPJPN	マイクロSSP ABC/DRDQ JPN	10 tests
SSPABDR	マイクロSSP AB/DR	10 tests

# マイクロSSP アリルスペシフィックトレー



- **用途** : 高解像度のアリルタイピング
- **製品例** :

商品コード	商品名	梱包単位
SSPR1-01	マイクロSSP Allele Specific A*01/36	8 tests
SSPR1-02	マイクロSSP Allele Specific A*02	4 tests
SSPR1-07	マイクロSSP Allele Specific B*07	8 tests
SSPR1-08	マイクロSSP Allele Specific B*08	4 tests
SSPR2-101	マイクロSSP Allele Specific DRB1*01	8 tests
SSPR2-104	マイクロSSP Allele Specific DRB1*04	8 tests

# マイクロSSP JPNキットの作製コンセプト



- 日本人の抗原レベル (HLA型) を網羅
- 96ウェル・1枚で、A/B/C/DR/DQローカス及びDR51/52/53を検索
- 緊急検査への適応 (脳死移植など)
- 日本臓器移植ネットワークから依頼により、共同でプライマーの選択
  - 1997年 開発開始 → 1998年 発売

# マイクロSSP JPNキットの開発の流れ



日本人の抗原頻度に合わせてプライマーの選択

パターン解析/コードシートの作成

One Lambda社での試作ロットのテスト

日本国内での試作ロットのテスト

製品化

# マイクロSSP JPNキットのメリット

- 既存のマイクロSSPプロトコールを使用
- A/B/C/DR/DQ及びDR51/52/53を一回 (1枚のトレー)の増幅で同時タイピングを可能
  - メーカー既存品を使用する場合：SSP1L + SSP2L
- 日本人頻度の0.01%以上では、HLA型のambiguityがなく判定可能
- 日本人頻度の99.0%の抗原の検出可能



# SSPJPN 最近のロットの特徴



- 1999年、マイクロSSP JPNを販売開始
- 抗原頻度の変化に対応
- Lot#005～ A29アレルの追加
  - 1999年当時 A29 は日本人では報告なし (VR)
  - 現在A29は 0.03%のアレル頻度との報告
- ユーザーからの要望と情報を反映
- 臓器移植ネットワーク用の早見表を提供