



今日から始めるHLA Vol.4 LABType入門

LABType試薬の概要と手技

株式会社ベリタス

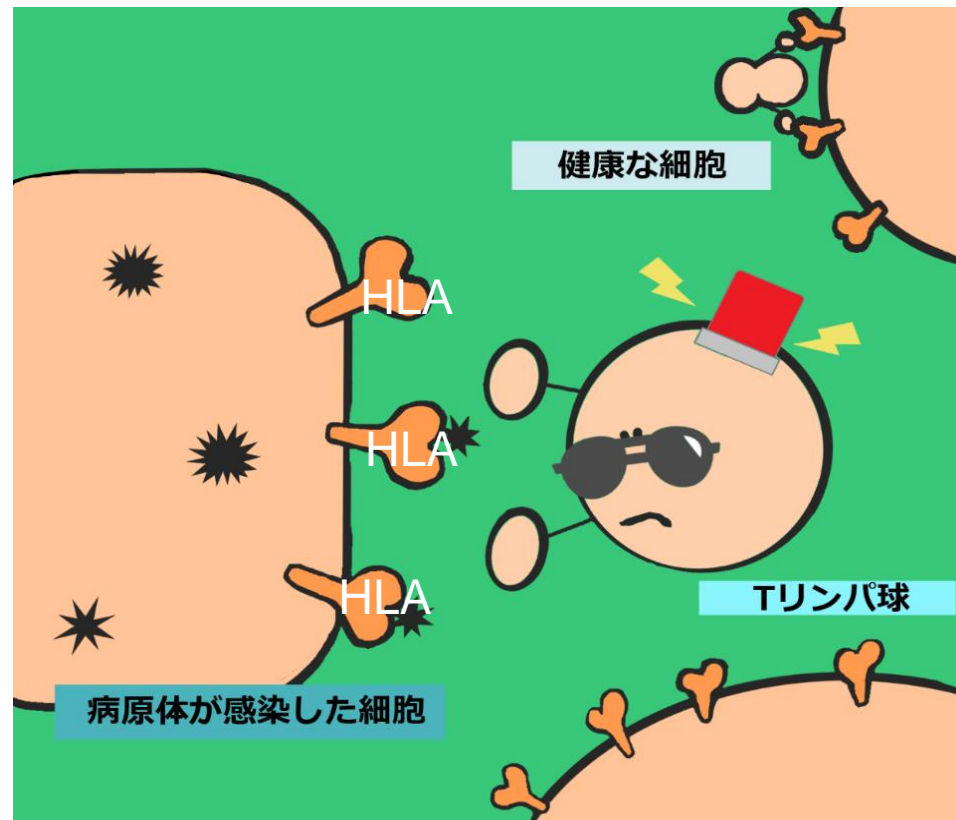
2024/2/29



HLAとは

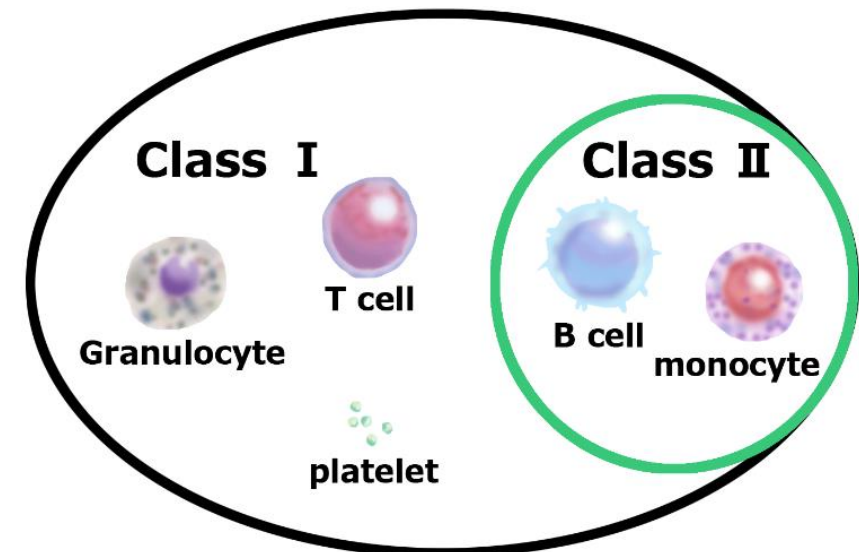
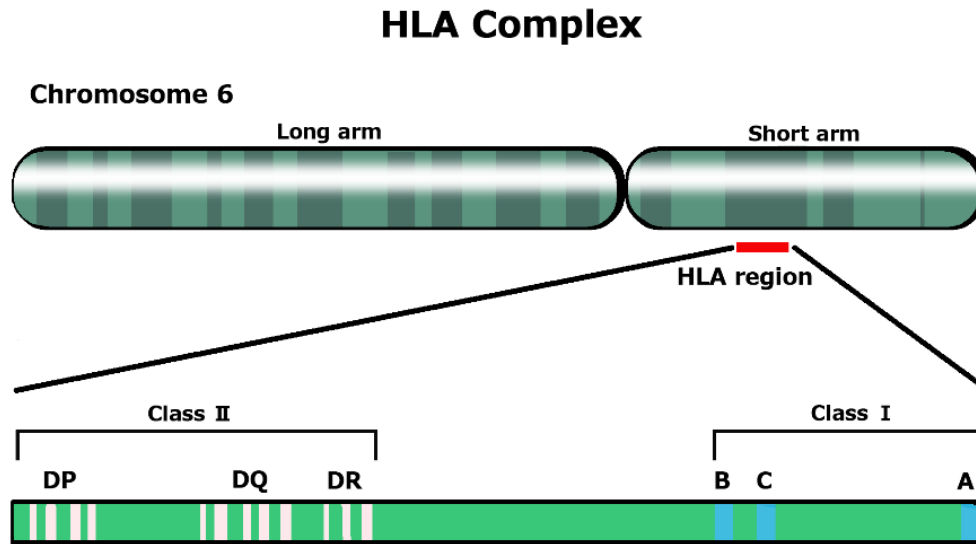
HLAの役割

- 様々な細胞の表面に発現している抗原
- 病原体に感染したり、移植等により外来抗原が入ってきた際に細胞外に外来抗原を提示



HLA(Human Leukocyte Antigen)

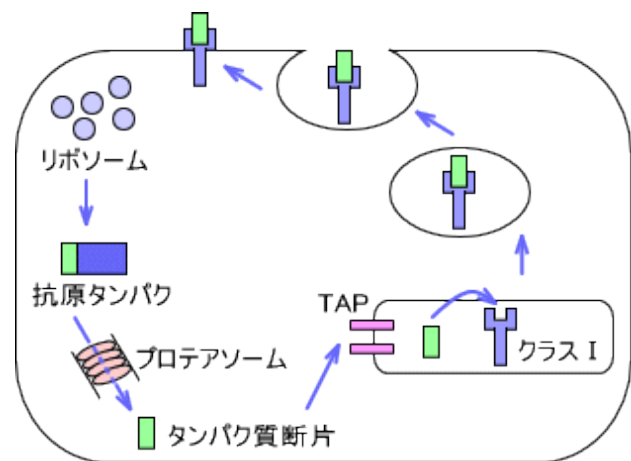
- 第6染色体の短腕部に存在
- A, B, C, DR, DQ, DPなど多くの抗原で構成
- ヒト白血球抗原として発見されたが、現在は多くの細胞に発現していることがわかっている



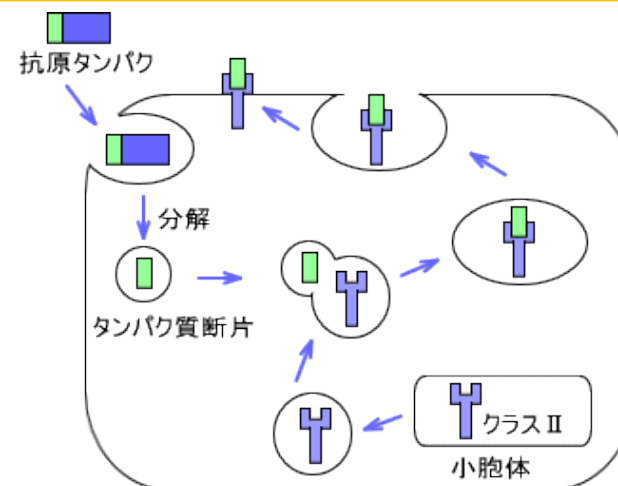
Class IとClass IIの違い

Class I	項目	Class II
A, B, C	主な抗原 (ローカス)	DR, DQ, DP
ほとんどの有核細胞 (血小板等)	発現している細胞	抗原提示細胞
細胞内で合成された タンパク質	抗原として提示するもの	細胞外から入ってきた タンパク質
キラーT細胞	抗原を認識する細胞	ヘルパーT細胞

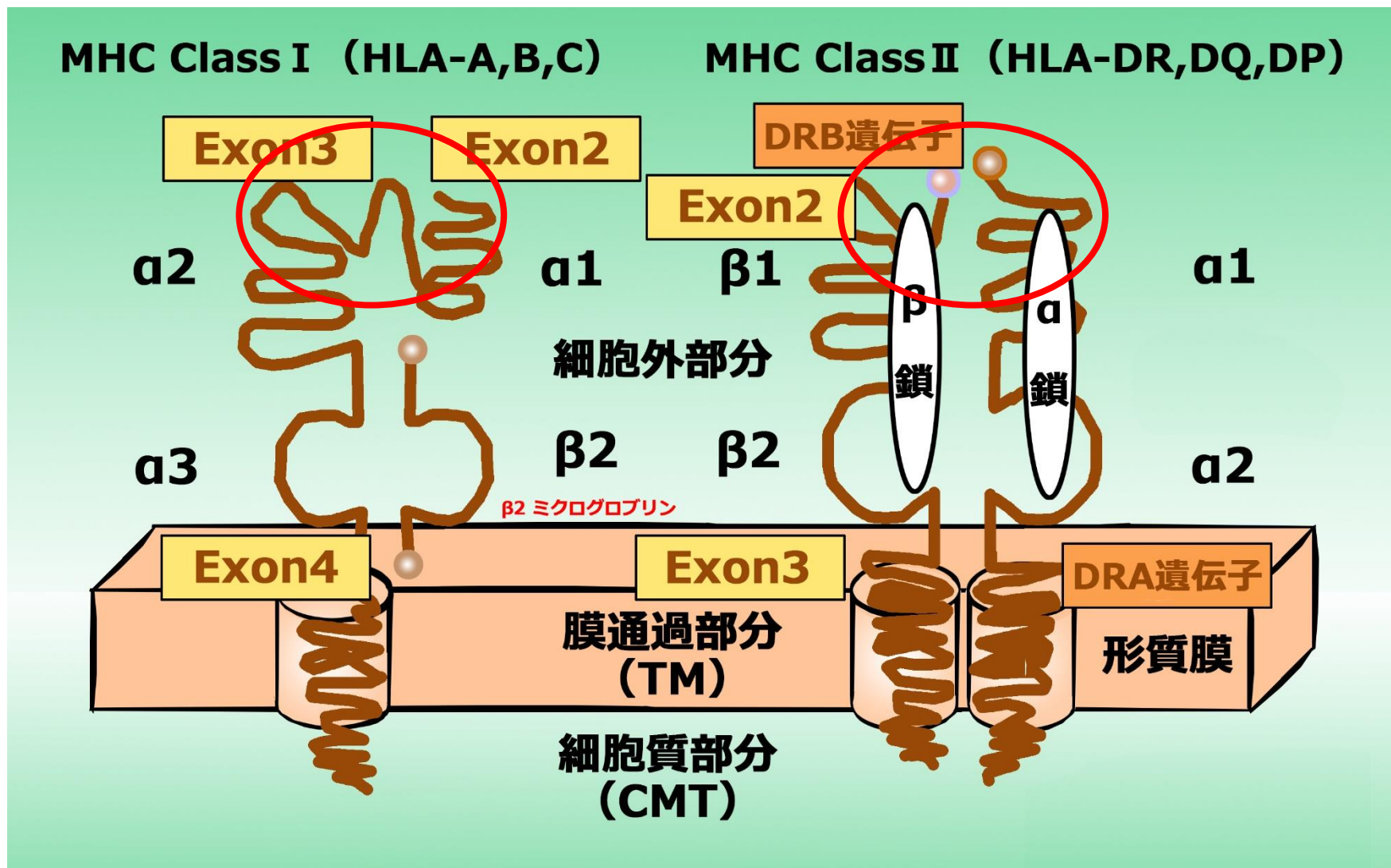
Class I : 内在性のタンパク質 (ペプチド) を提示



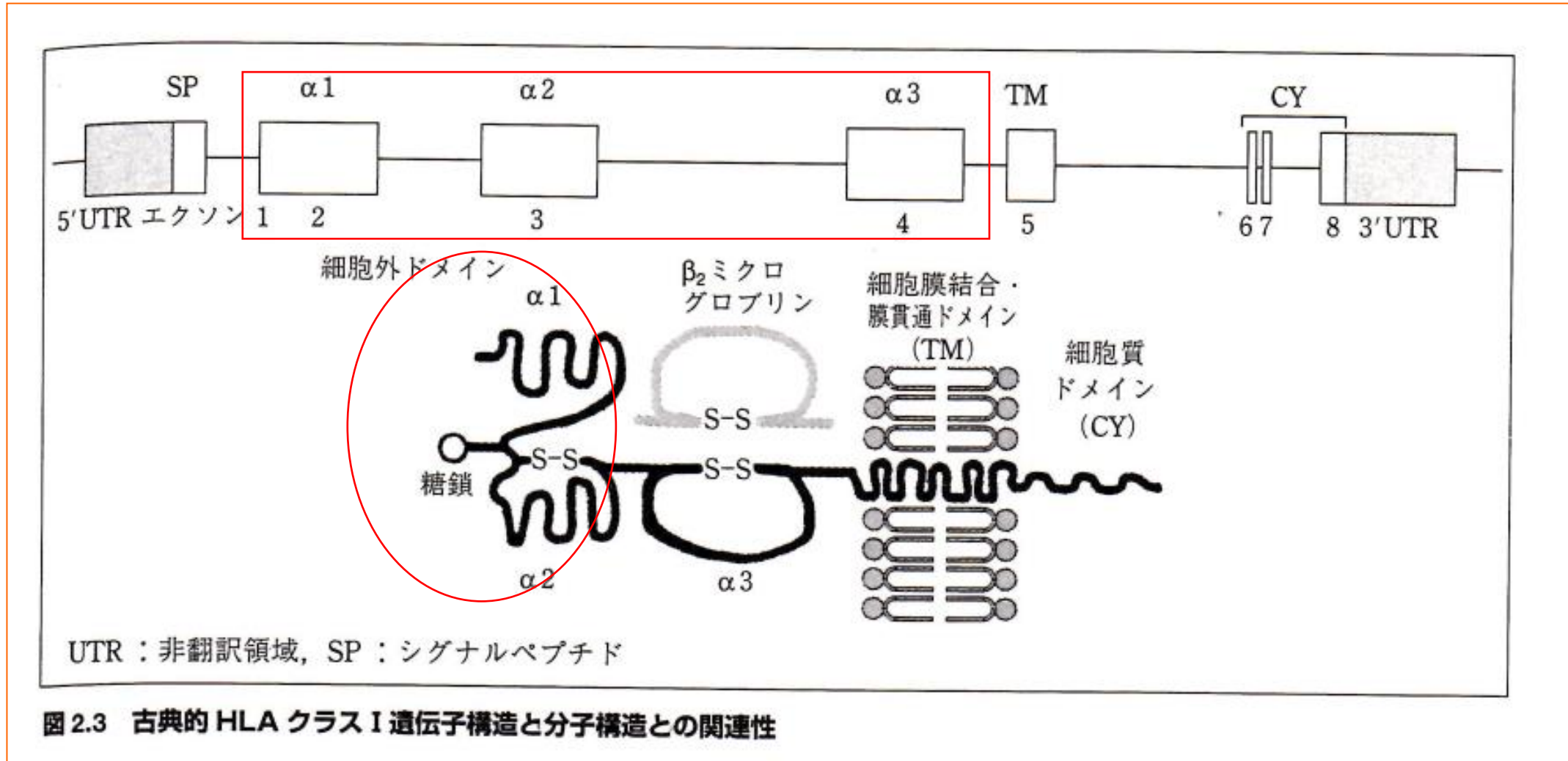
Class II : 外来性のタンパク質 (ペプチド) を提示



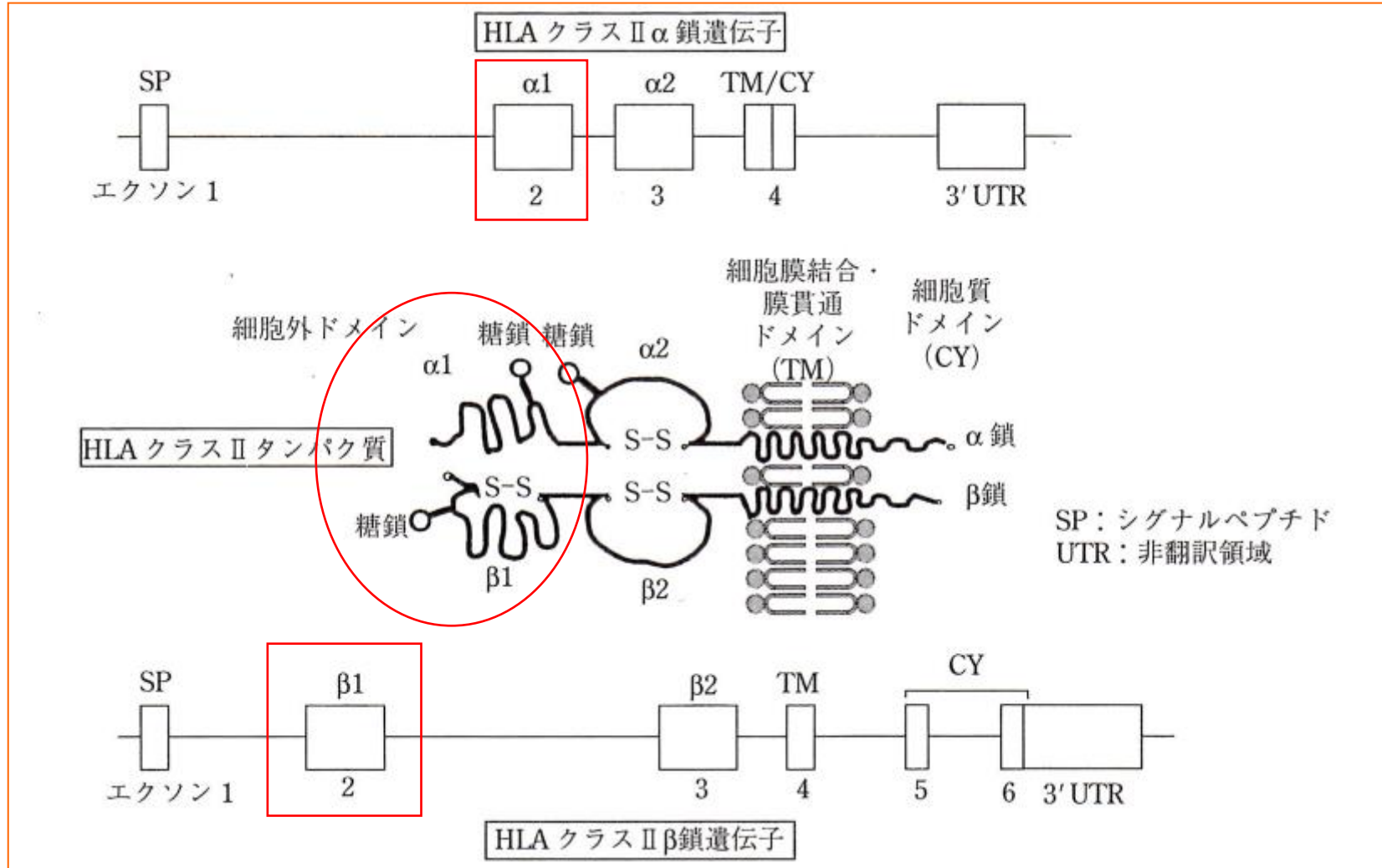
図は<http://kusuri-jouhou.com/immunity/hijiko.html>より抜粋



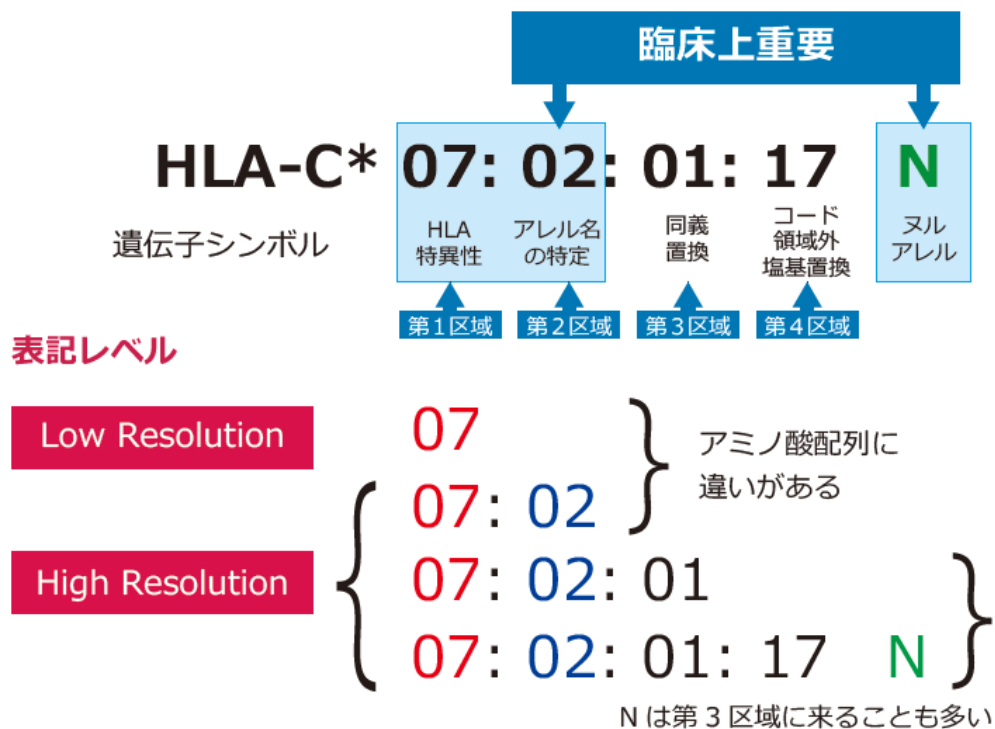
タイピング領域(Class I)



タイピング領域(Class II)



HLAの表記方法



区域	呼称	表記例
第1区域	2桁、抗原型、血清型、HLA型	Cw7
第2区域	4桁、アレル型、DNA型	HLA-C*07:02
第3区域	6桁	HLA-C*07:02:01
第4区域	8桁	HLA-C*07:02:01:17N

HLAの特長①多様性と頻度

- 人種によりアレル頻度は大きく異なる
- 多様性が非常に高く膨大な数のアレルが存在する
 - 頻度によるみなし判定をする場合は検体に適した頻度データを使用することが重要

世界でのA*24:02の頻度



日本 : 37.9%

US : 7.8%

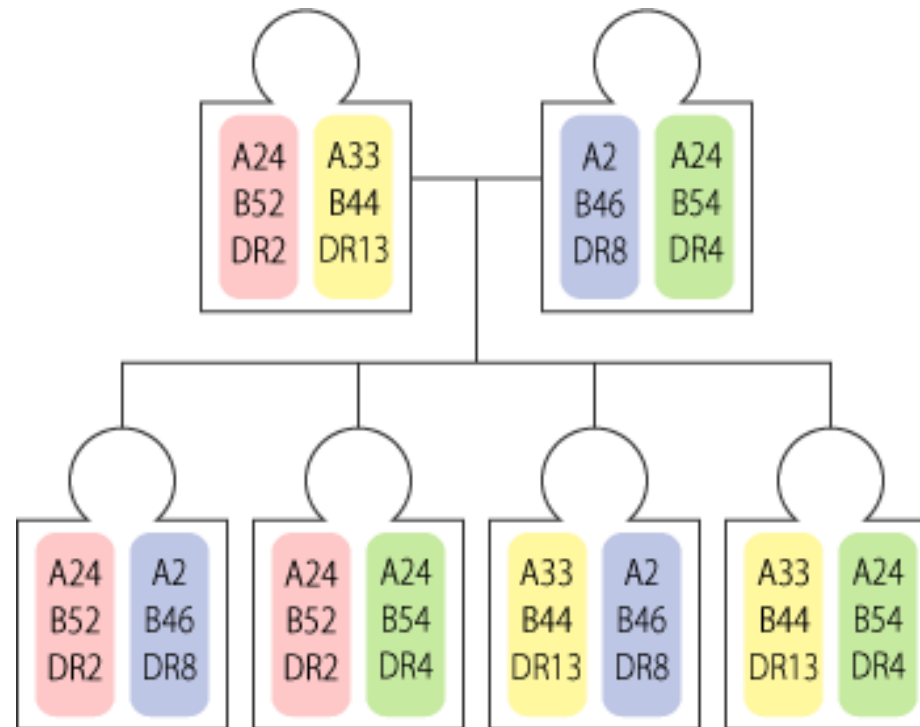
ローカス	アレル数
A	8,098
B	9,656
C	8,084
DRB	4,581
DQA1	722
DQB1	2,510
DPA1	639
DPB1	2,486

Allele Frequency Net Database
<http://www.allelefrequencies.net/hla.asp>

IMGT/HLA 3.55.0, 2024 Jan
<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/about/statistics/>

HLAの特長②ハプロタイプ

- 親より受け継いだHLAの組み合わせがハプロタイプ
- ハプロタイプは維持されたまま親から子に遺伝する
 - 兄弟でHLAが一致する確率は25%

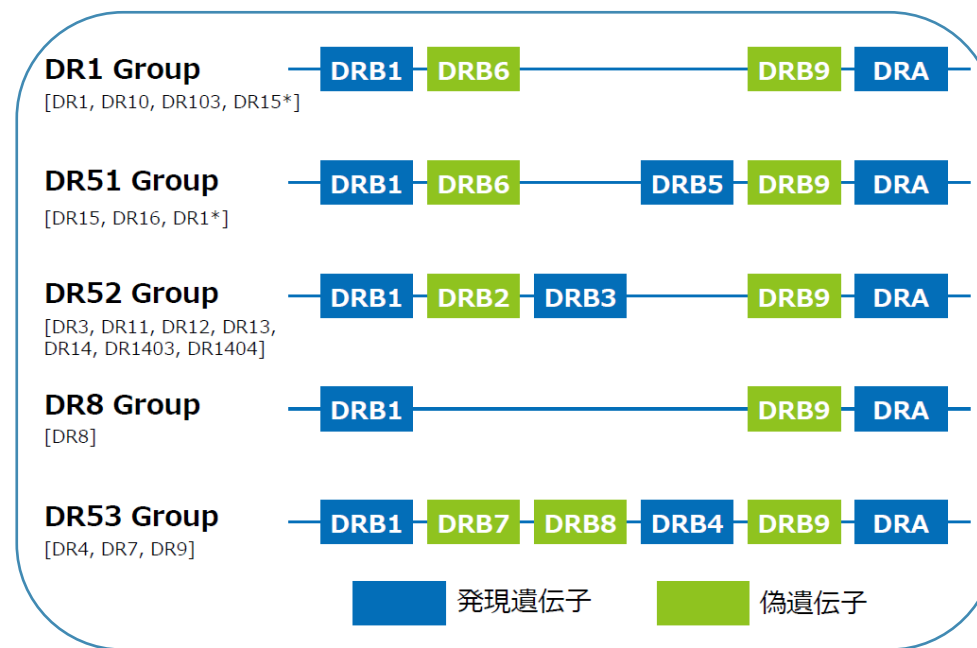


HLAの特長③連鎖

DRB1とDQB1/DQA1の連鎖

DRB1	DQB1																				
	DQA1	DQA1*01:01	DQA1*01:02	DQA1*01:04	DQA1*01:03	DQA1*01:02	DQA1*01:01	DQA1*02:01	DQA1*03:03	DQA1*05:03	DQA1*05:05	DQA1*05:06	DQA1*05:07	DQA1*05:08	DQA1*06:01	DQA1*03:01	DQA1*03:02	DQA1*03:03	DQA1*04:01	DQA1*04:02	
DRB1*01:01																					DRB1*01:01
DRB1*10:01																					DRB1*10:01
DRB1*08:02																					DRB1*08:02
DRB1*08:03																					DRB1*08:03
DRB1*15:01	DRB5*01:01																				DRB1*15:01
DRB1*15:02	DRB5*01:02																				DRB1*15:02
DRB1*16:02	DRB5*02:02																				DRB1*16:02
DRB1*13:01																					DRB1*13:01
DRB1*12:01	DRB3*01:01																				DRB1*12:01
DRB1*14:03																					DRB1*14:03
DRB1*14:12																					DRB1*14:12
DRB1*03:01																					DRB1*03:01
DRB1*11:01																					DRB1*11:01
DRB1*13:07	DRB3*02:02																				DRB1*13:07
DRB1*14:06																					DRB1*14:06
DRB1*14:54																					DRB1*14:54
DRB1*14:07																					DRB1*14:07
DRB1*14:05																					DRB1*14:05
DRB1*12:02	DRB3*03:01																				DRB1*12:02
DRB1*13:02																					DRB1*13:02
DRB1*04:01	DRB4*01:02																				DRB1*04:01
DRB1*04:05																					DRB1*04:05
DRB1*04:10																					DRB1*04:10
DRB1*04:03																					DRB1*04:03
DRB1*04:06	DRB4*01:03																				DRB1*04:06
DRB1*04:07																					DRB1*04:07
DRB1*07:01																					DRB1*07:01
DRB1*09:01																					DRB1*09:01

DRB1とDRB345の連鎖



(HLA検査に必要なHLAの基礎知識 中島様講演会資料)

動画のご紹介 -HLAとは

- 昨年4月に開催いたしましたWeb講演会で詳しく説明しておりますので是非ご覧ください
 - https://www.veritastk.co.jp/products/reference_detail/weblecture-hlabasic8_1.html



The graphic features a central illustration of a doctor in a white coat and green cap, holding a stethoscope and pointing upwards. To his left, three children in school uniforms are running. The text '今日から始める HLA' is prominently displayed at the top left, with the VERITAS logo at the top right. Below the illustration, the word 'START' is written in large, bold letters. A pink banner at the bottom left indicates the date '2023年4月27日開催'. On the right side, a diagram compares MHC Class I (HLA-A, B, C) and MHC Class II (HLA-DR, DQ, DP). The MHC Class I diagram shows a heavy chain with $\alpha 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 3$ domains and a light chain with $\beta 2$ domain, binding an internal peptide. The MHC Class II diagram shows two heavy chains with $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains and two light chains with $\beta 1$ and $\beta 2$ domains, binding an external peptide. Labels include '細胞膜部分 (CYT)', '膜貫通部分 (TM)', and '糖鎖'.

今日から始める HLA

VERITAS

MHC Class I (HLA-A, B, C)

MHC Class II (HLA-DR, DQ, DP)

内因性ペプチドを提示

外因性ペプチドを提示

$\alpha 2$ $\alpha 1$ $\alpha 3$ $\beta 2$ $\beta 1$ $\alpha 1$ $\alpha 2$

細胞膜部分 (CYT)

膜貫通部分 (TM)

糖鎖

START

2023年4月27日開催

Vol.1 HLA 入門
第1部 HLA とは



VERITAS

Veritas Corporation

LABType試薬とは

HLAタイピング検査法



RSSO(Reverse Sequence Specific Oligonucleotide)法

PCR増幅

- ビオチンで標識したプライマーを使用して目的の遺伝子領域を増幅

アルカリ変性

- アルカリ性の条件のもとで2本鎖を1本鎖にする

ハイブリダイゼーション

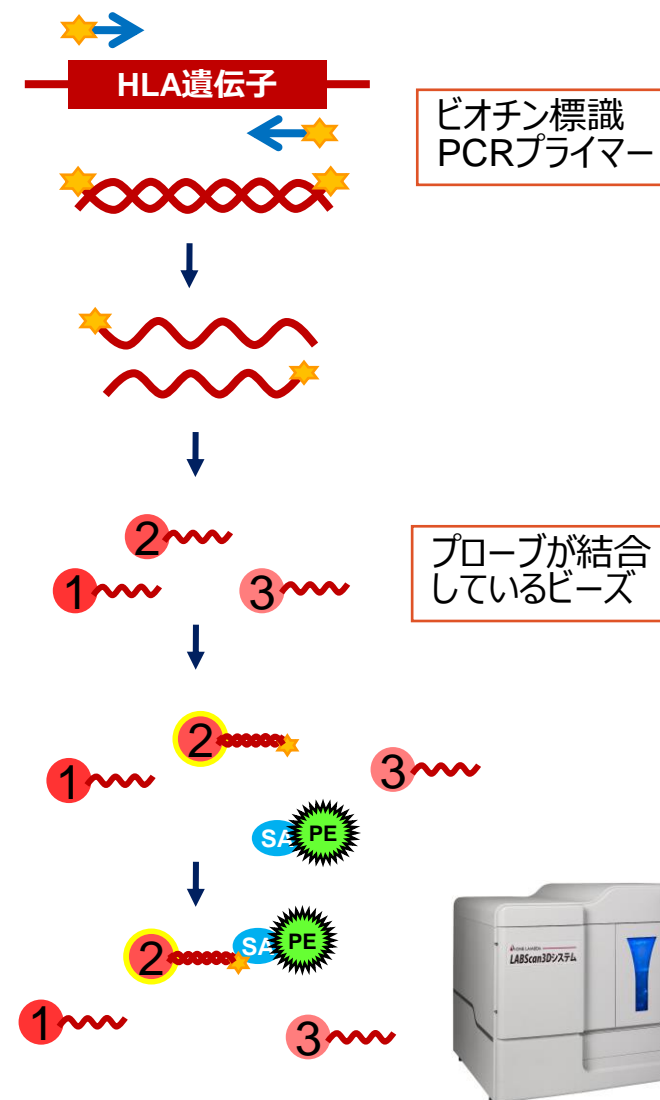
- プロブが結合しているビーズに1本鎖にしたDNAを反応させる

SAPEでの標識

- ビオチンに蛍光標識をしたストレプトアビジンと結合させる

測定

- LABScanシステム/LABScan3Dシステムで測定



試薬の種類と解像度

- ・タイピング領域が広いほどビーズのプローブ数が多く、解像度が高くなる

ローカス	SSO	CWD	XR
A	Exon2-3	Exon2-5	Exon2-5
B	Exon2-3	Exon2-5	Exon2-5
C	Exon2-3	Exon2-7	Exon2-7
DR	Exon2	Exon2	Exon2
DQ	Exon2	-	-
DP	Exon2	-	-

Locus	プローブ数		
	SSO	CWD	XR
A	83	204	954
B	119	210	1080
C	64	187	1180
DRB1	79	140	416
DQB1	68	-	-
DQA1	34	-	-
DPB1	225	-	-
DPA1	29	-	-

製品群	測定機器	解像度
LABType SSO	LABScanシステム/LABScan3Dシステム	2桁
LABType CWD	LABScan3Dシステムのみ	4桁
LABType XR	LABScan3Dシステムのみ	4桁

LABType製品一覧

2桁タイピング

DQとDPはα鎖とβ鎖を同時にタイピング可能

商品名	商品コード	梱包単位	商品コード	梱包単位
LABType SSO HLA A Locus	RSSO1A	100 tests	RSO1AT	20 tests
LABType SSO HLA B Locus	RSSO1B	100 tests	RSO1BT	20 tests
LABType SSO HLA C Locus	RSSO1C	100 tests	RSO1CT	20 tests
LABType SSO HLA DRB1	RSSO2B1	100 tests	RSO2B1T	20 tests
LABType SSO HLA DRB3,4,5	RSSO2345	100 tests	RSO2345T	20 tests
LABType SSO HLA DQA1/DQB1	RSSO2Q	100 tests	RSO2QT	20 tests
LABType SSO HLA DPA1/DPB1	RSSO2P	100 tests	RSO2PT	20 tests

商品名	商品コード	梱包単位	商品コード	梱包単位
LABType CWD Class I A Locus	RSSOW1A	100 test	RSOW1AT	20 test
LABType CWD Class I B Locus	RSSOW1B	100 test	RSOW1BT	20 test
LABType CWD Class I C Locus	RSSOW1C	100 test	RSOW1CT	20 test
LABType CWD Class II DRB1 Locus	RSSOW2B1	100 test	RSOW2B1T	20 test

商品名	商品コード	梱包単位	商品コード	梱包単位
LABType XR Class I A Locus	RSSOX1A	100 test	RSOX1AT	20 test
LABType XR Class I B Locus	RSSOX1B	100 test	RSOX1BT	20 test
LABType XR Class I C Locus	RSSOX1C	100 test	RSOX1CT	20 test
LABType XR Class II DRB1 Locus	RSSOX2B1	100 test	RSOX2B1T	20 test

4桁タイピング
LABScan3Dシステム専用試薬

LABTypeキット内容

	試薬名	注意点
PCR前	Locus-Specific Primer Set	冷凍 (-20°C以下)
	Primer Set D-mix	冷凍 (-20°C以下)、紫色の液体
PCR後	Bead Mixture	解凍後3か月以内に使用 開封後は冷蔵・遮光、再凍結禁止
	Denaturation Buffer	25°C以下で保存 NaOHのため取扱い注意
	Neutralization Buffer	25°C以下で保存、紫のキャップ
	Hybridization Buffer	25°C以下で保存
	Wash Buffer	25°C以下で保存
	SAPE Buffer	冷蔵 (2-8°C) 保存

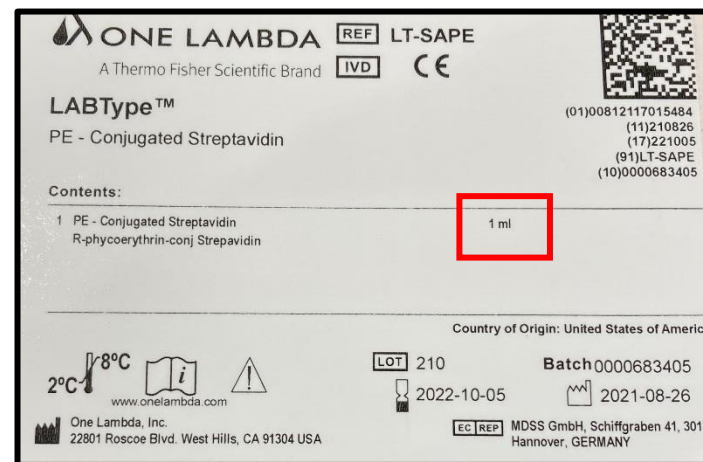


- Primer setとBeads Mixtureは試薬の種類、ローカスごとに異なる
- その他の試薬は全てのLABTypeキットで共通

キット以外に必要な試薬

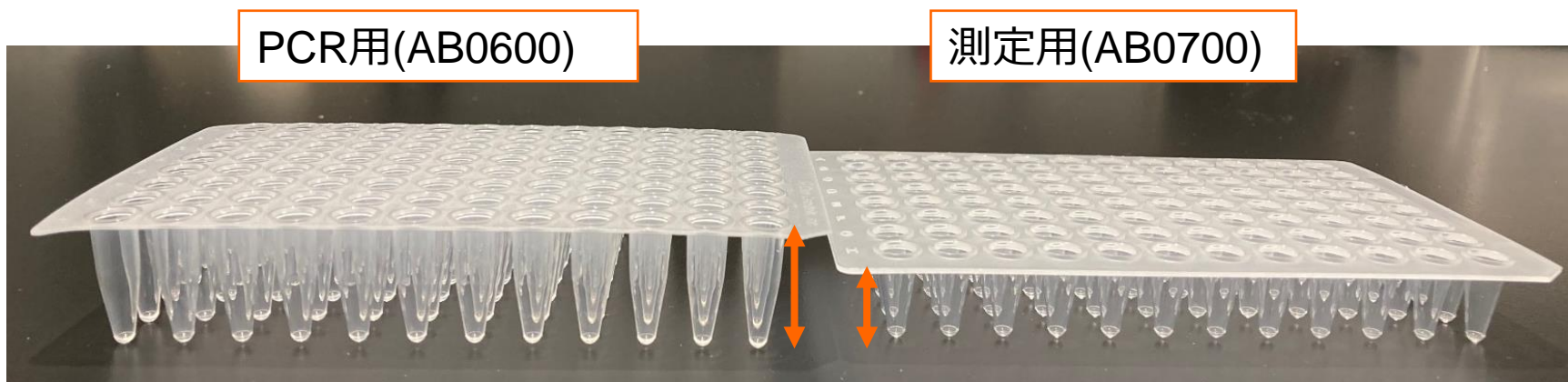
種類	商品名	メーカー
SAPE (標識試薬)	PE-Conjugated Streptavidin	ベリタス(One Lambda)LT-SAPE 精製水で溶解、冷蔵で6か月保存
PCRポリメラーゼ	AmpliTaq DNA Polymerase Goldは不可	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) N8080160

- SAPEはLABTypeキットに含まれない (別売)
 - 粉末の試薬のため事前にラベルに記載されている容量の精製水で溶解
 - 溶解後は冷蔵で6か月保存可能



キット以外に必要な消耗品

種類	商品名	メーカー
プレート	PCRプレート(PCR用)	Thermo Fisher Scientific AB0600
	PCRプレート(ロープロファイル、測定用)	Thermo Fisher Scientific AB0700
PCRシール	Adhesive Sealing Sheet	Thermo Fisher Scientific AB0558
	SSP Tray Seals (ハイブリ用)	ベリタス (One Lambda) SSPSEA300/同等品でも可



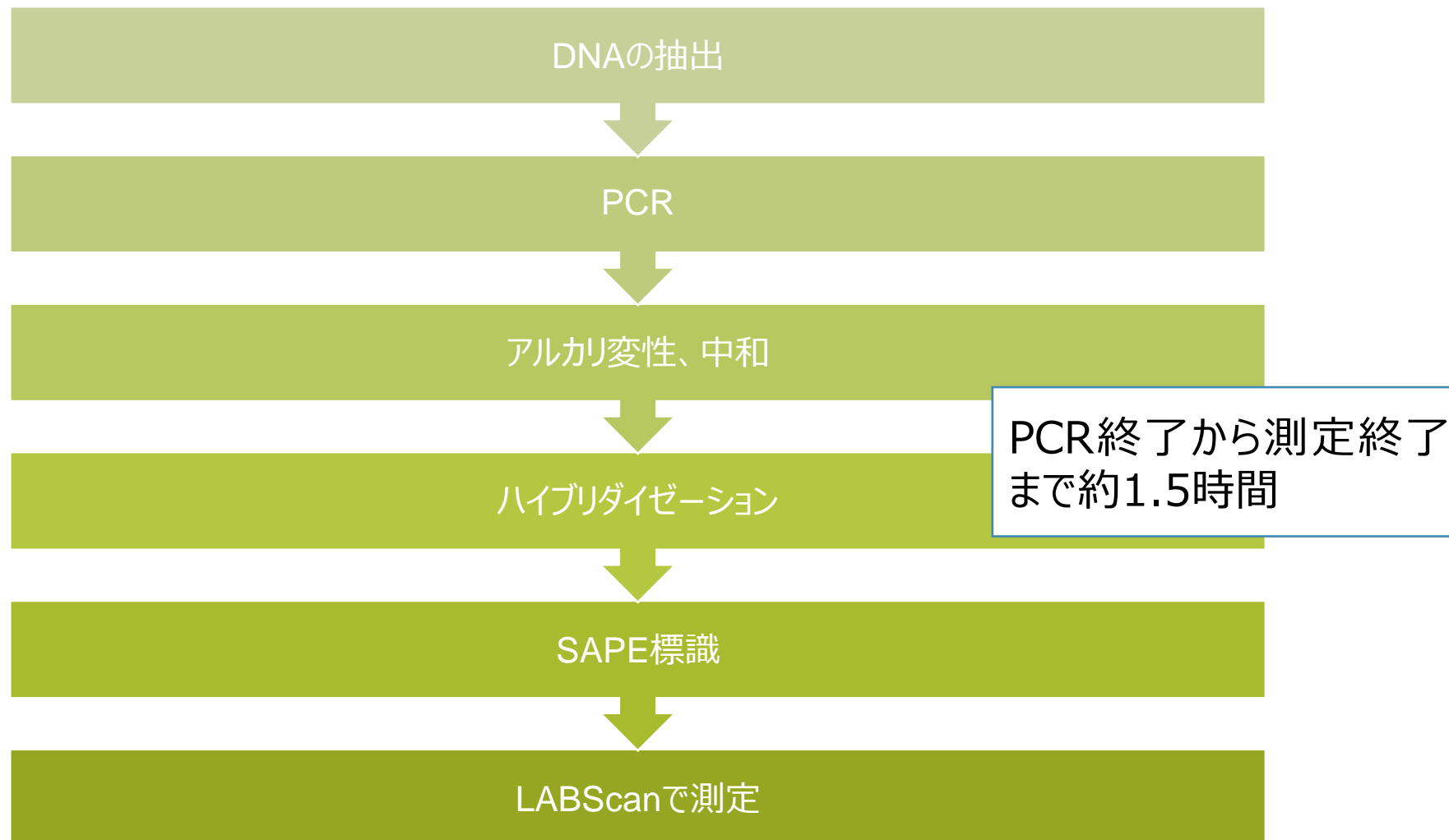
キット以外に必要な器具

種類	商品名	メーカー
サーマルサイクラー	Veriti 96-Well サーマルサイクラー	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)
PCRパッド	マイクロSSP PCR用パッド PE9700用	ベリタス (One Lambda) SSPPADTN
遠心機	プレート遠心機	96Wellプレートを1300g以上で遠心ができる機器/メーカー不問
測定機器	LABScanシステム/LABScan3Dシステム	ベリタス (One Lambda)



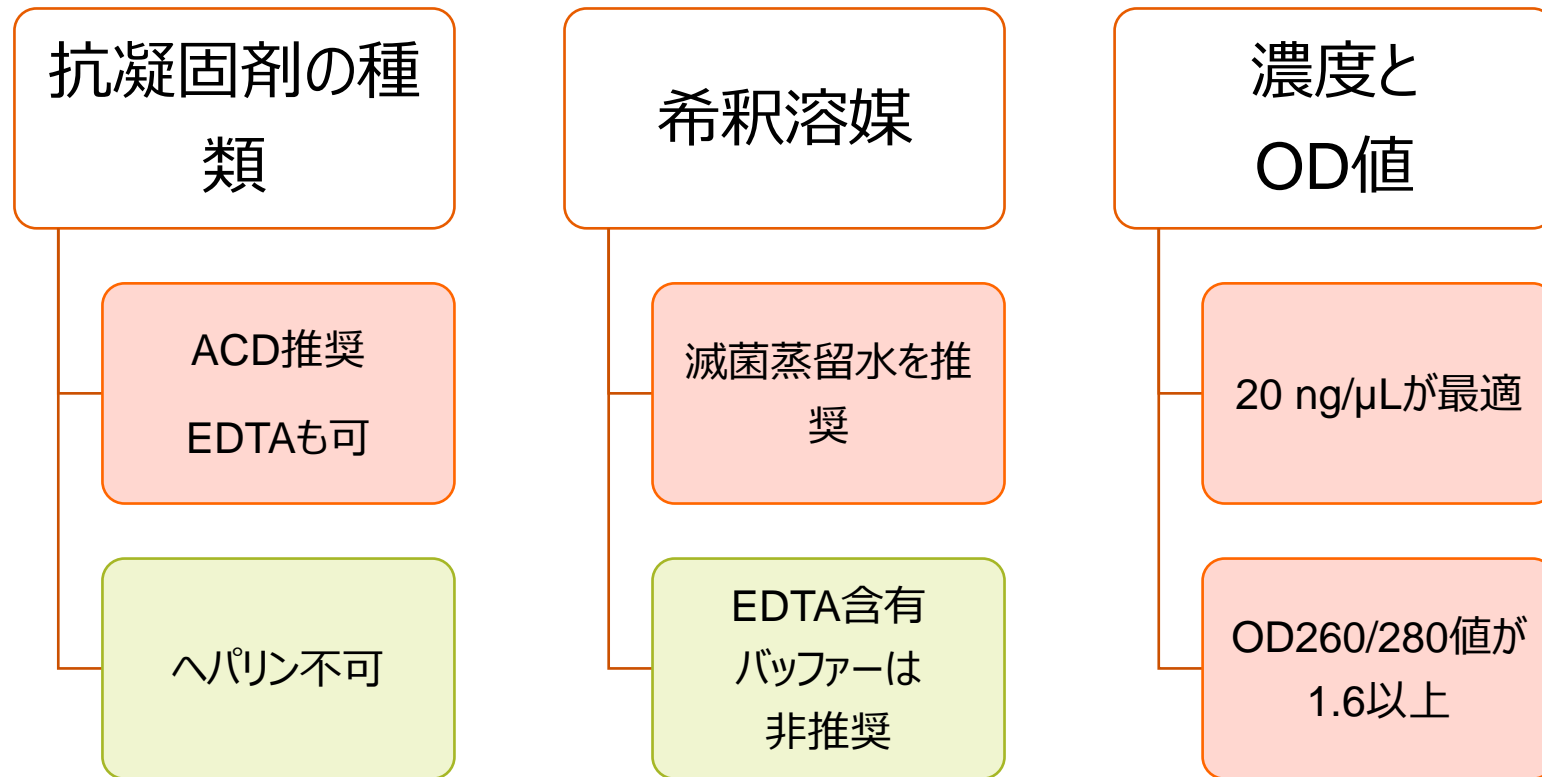
手技のポイント

LABTypeの操作の流れ



DNAの抽出

- PCRに適した品質、濃度のDNAを抽出
- PCRを阻害する成分の混入を避ける



PCR試薬の調整

- DNA検体、D-mix、Primer mixを解凍
- プレミックス液の容量(ローカス毎に調整)

Primer mix	4.0 μ L
D-mix	13.8 μ L
Ampli Taq	0.2 μ L
合計(/1Well)	20.0 μ L

- D-mix、プライマーはよくボルテックス
- Ampli Taqは使用直前に冷凍庫から取り出し、ピペティングでよく混ぜる(ボルテックス不可)
- 検体数が少ない場合は、D-mixとTaqのみを先に混合する

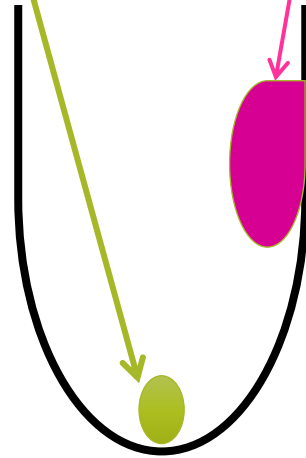


検体とプレミックス液の分注

(1) DNA 2.0 μL をPCR
トレイの底部に分注

(2) プレミックス液 18 μL を分注

- D-mix (13.8 μL)
- Primer mix(4 μL)
- Ampli Taq (0.2 μL)

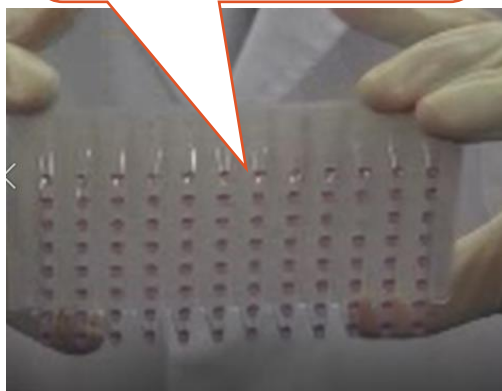


- PCRトレイはAB0600、PCRシールはAB0558 (共にThermo Fisher Scientific社製)を使用
- プレミックス液は氷上で分注する
- プレミックス液を分注した後はできるだけ速やかにサーマルサイクラーへ入れる

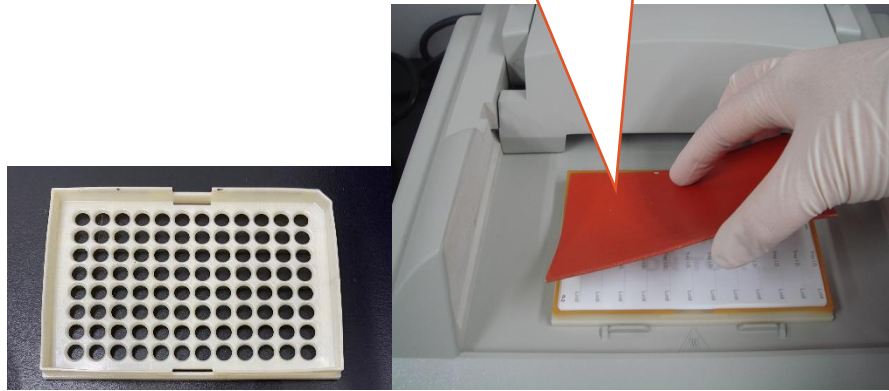
PCR (約85分)

- プラスチックトレイ、パッドの使用で蒸発防止
- 9600モード(Simulation Mode)を使用
- ホットスタートを推奨

試薬がウェルの底にあることを確認



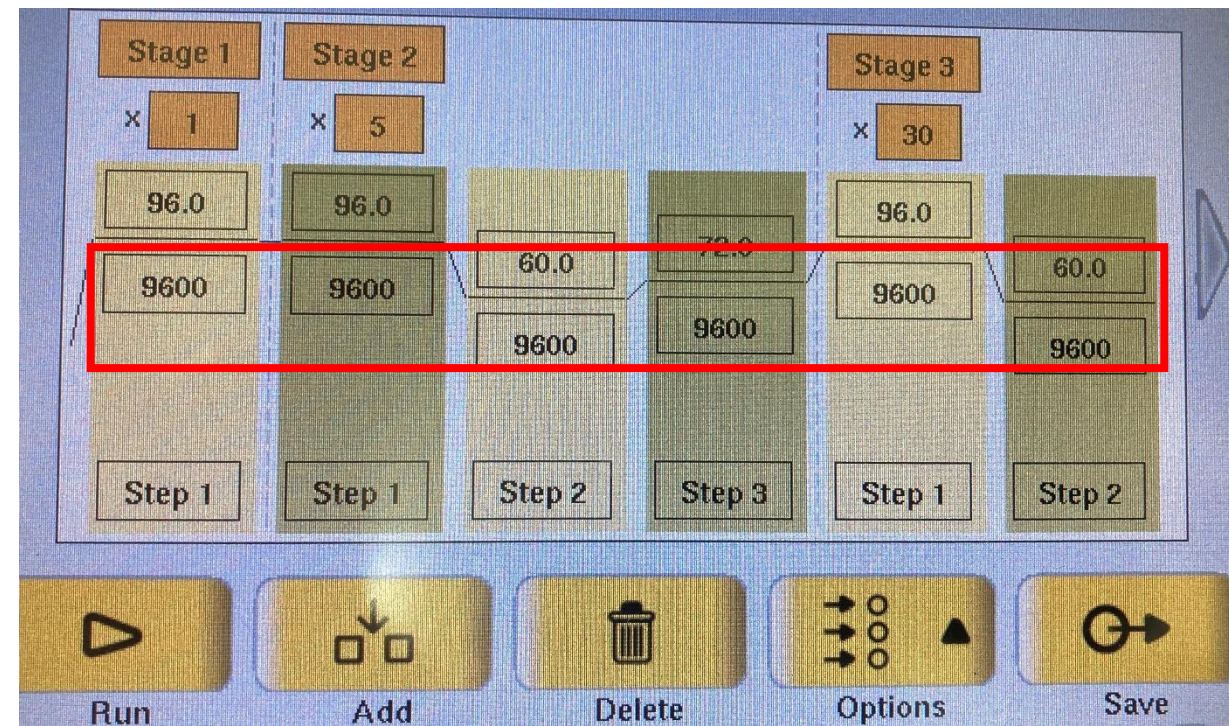
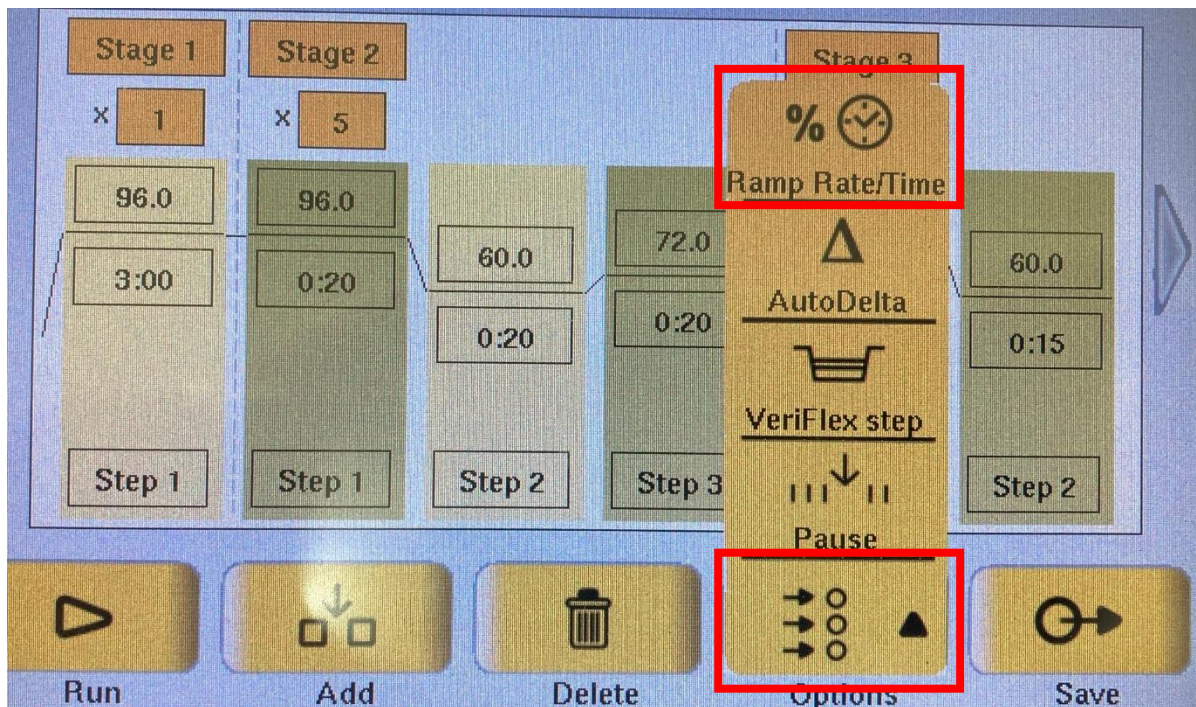
パッド&トレイで蒸発防止



PCR条件 (Reaction volumeは20 uL)

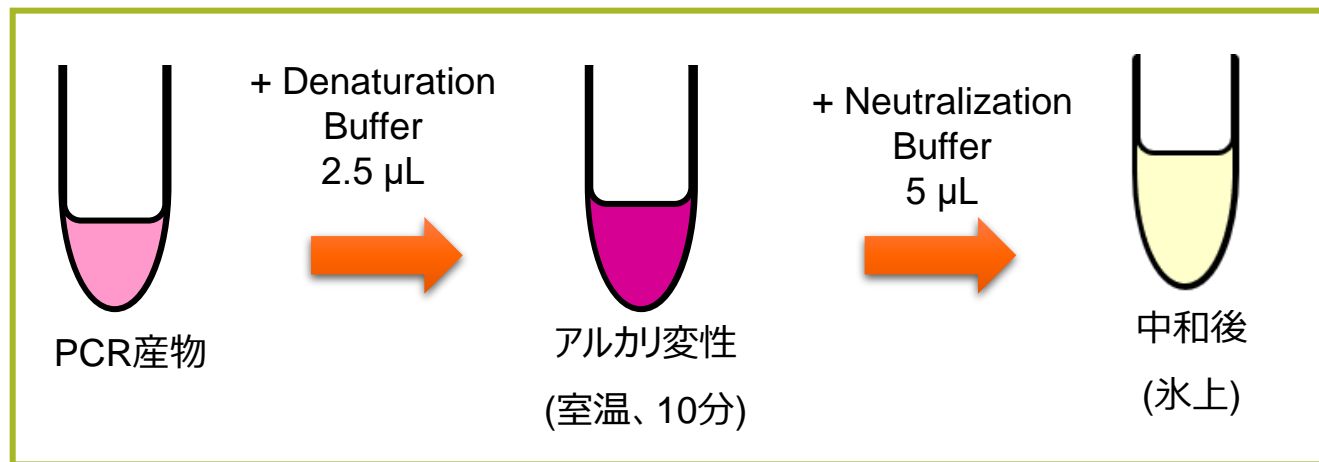
温度	時間	サイクル数
96°C	3 min	1 cycle
96°C	20 sec	5 cycles
60°C	20 sec	
72°C	20 sec	
96°C	10 sec	30 cycles
60°C	15 sec	
72°C	20 sec	
72°C	10 min	1 cycle
4°C	Forever	

9600モード(Simulation Mode)の確認方法



アルカリ変性、中和

- PCRトレイはAB0700(Thermo Fisher Scientific社製)を使用
- PCR産物をサーマルサイクラーから取り出した際に、サーマルサイクラーを60°Cに設定
- PCRチューブの底にDenaturation Buffer 2.5 μ Lを分注しスピンドウン
- PCR産物 5 μ Lを8連ピペット(推奨)で分注し、ピペッティングで混合
 - 溶液が濃いピンクに変色することを確認
- 室温で10分間静置。反応の間にビーズ試薬を調整 (次スライド)
- 10分後、Neutralization Bufferを5 μ L加えピペッティングでしっかり混合
 - 溶液が透明に変色することを確認
 - 透明にならない場合は、透明になるまで1 μ Lずつ追加



- アルカリ変性の反応中に調整
- Bead Mixtureは、ボルテックス後にスピンドウンし、しっかりとピペティングで混合
- Beads試薬はローカス毎に調整

Bead Mixture	4.0 μ L
Hybridization Buffer	34.0 μ L
合計(/1Well)	38.0 μ L

- 調整後は氷上に置く

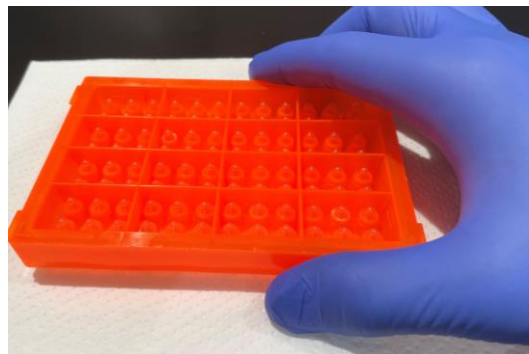
- 中和後のトレイを氷上に置き、氷上で分注する
- Beads試薬を38.0 μL ずつ分注
 - ローカス毎に試薬は異なるので、分注間違いに注意
 - できるだけ速やかに分注
- 分注後、シールを貼り速やかにサーマルサイクラーへ入れる
- サーマルサイクラーで60°C、15分間反応
- サーマルサイクラーから取り出した後は速やかに氷上に置き、速やかにWash Bufferを追加

洗浄操作（3回繰り返す）

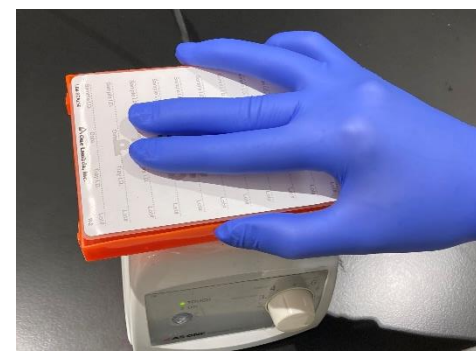
- Wash Bufferを100 μ L(1回目のみ70 μ L、氷上で行う)添加し、シールを貼る
- 1500g、3分間(1300g、5分間でも可)遠心
- フリッキングにより上清を除去
- キムタオルの上で軽く3回程度タッピングする
- ビーズのみの状態でボルテックス（ドライボルテックス）



フリッキング



タッピング



ドライボルテックス

- 3回目の洗浄時に調整、調整後は遮光保存
 - 2~3検体分多めに調整することを推奨
 - 全ローカス共通

SAPE溶液	0.5 μ L
SAPE Buffer	49.5 μ L
合計(/1well)	50.0 μ L

- 1 wellあたりの量
- 例えば、検体数:3、ローカス:4の場合は12(+2~3)well分を調整する

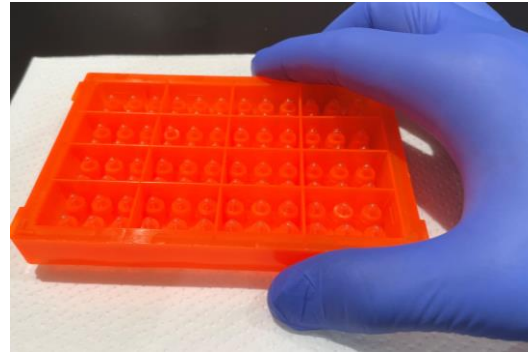
- SAPE溶液はLABTypeキットに含まれていない
 - 事前に精製水で溶解
 - 溶解後は冷蔵で6か月保存可能
- 50.0 μ Lずつ分注し、シールを貼りサーマルサイクラーで60°C、5分間反応

洗浄操作

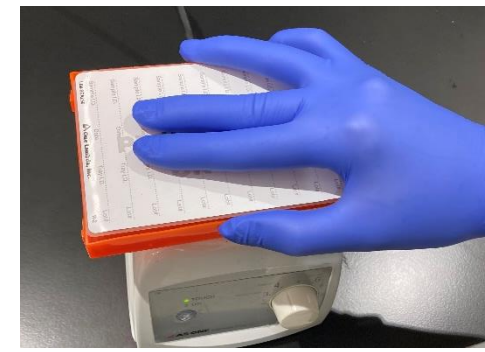
- Wash Bufferを70 μ L添加し、シールを貼る
- 1500g、3分間(1300g、5分間でも可)遠心
- フリッキングにより上清を除去
- キムタオルの上で軽く3回程度タッピングする
- ビーズのみの状態でボルテックス (ドライボルテックス)



フリッキング

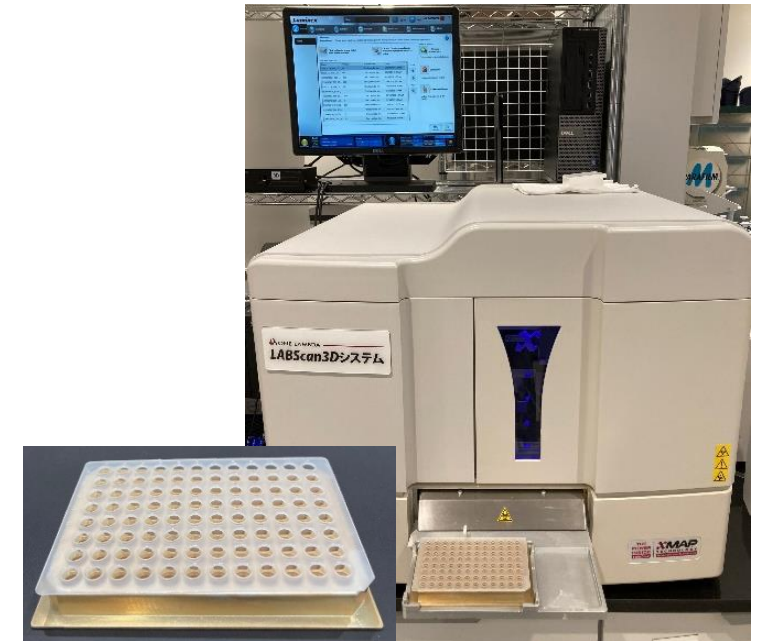


タッピング



ドライボルテックス

- 洗浄後、Wash Bufferを70 μ L加え測定
- 測定用のテンプレートファイルは試薬/ローカス/ロット毎に異なるため注意
 - テンプレートファイルはベリタスのWebよりダウンロード可能
 - https://www.veritastk.co.jp/hla/soft_file.html
- 調製後のサンプルはシールを貼り冷蔵&遮光で24時間保存可能
 - 測定前によくピペティングで混合してから測定する
- LABScanのメンテナンス
 - プローブ洗浄
 - Weekly Maintenance
 - Monthly Maintenance



ご清聴ありがとうございました
ご質問はございますでしょうか

