



# すぐに役立つHLA Vol.3 マイクロSSP入門

マイクロSSPの原理と手技

株式会社ベリタス

2022年12月7日

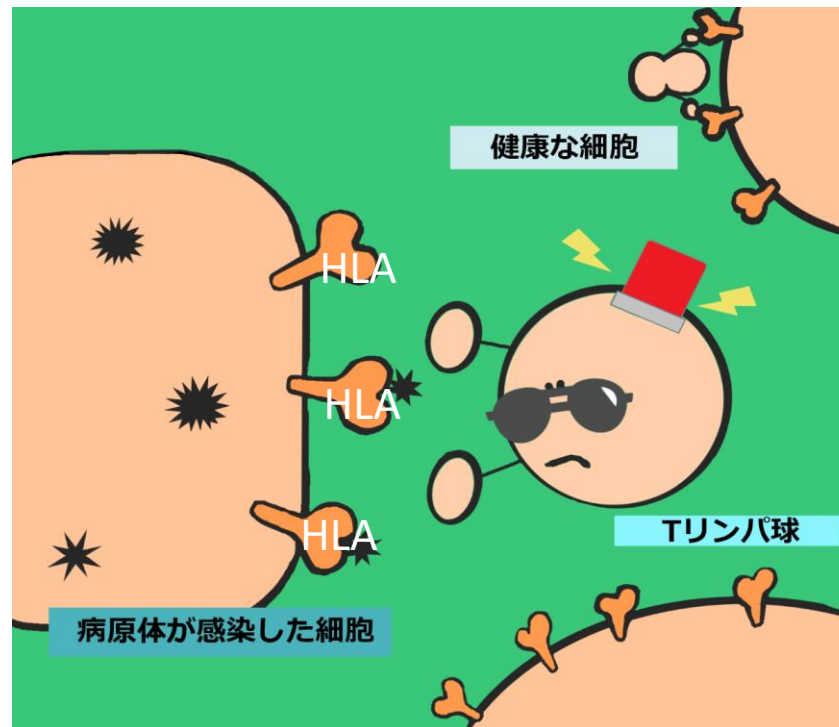
# 目次

- HLAとは
- SSP法の原理
- 手技のポイント

# HLAとは

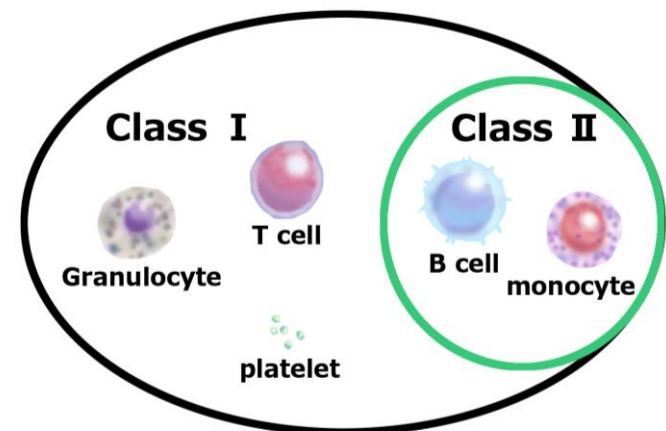
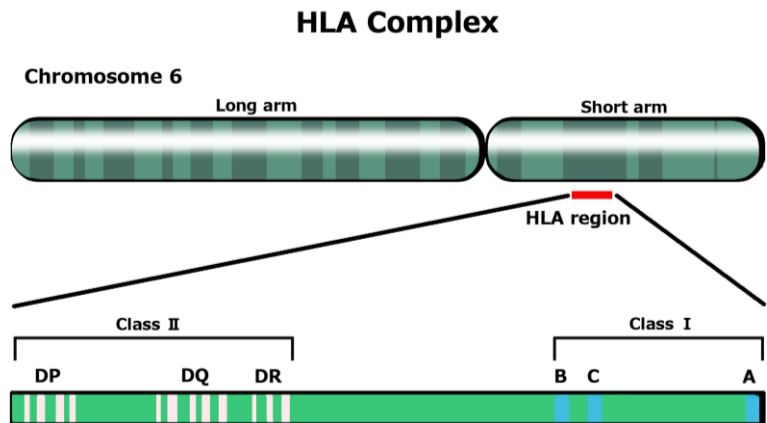
# HLAの役割

- 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)

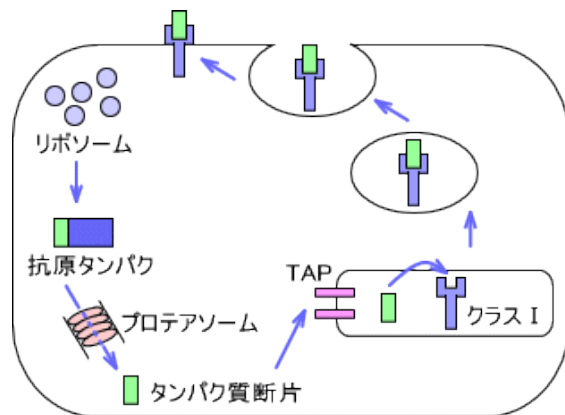
- 第6染色体の短腕部に存在
- A, B, C, DR, DQ, DPなど多くの抗原で構成
- ヒト白血球抗原として発見されたが、現在は多くの細胞に発現していることがわかっている



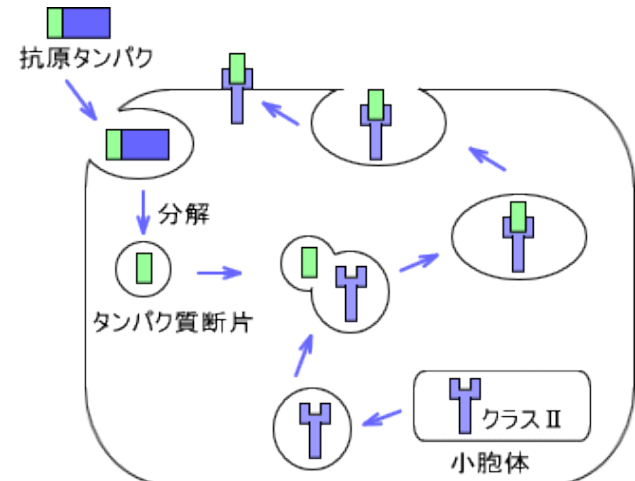
# Class IとClass IIの違い

Class I	比較項目	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=自己	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=非自己
キラーT細胞	抗原を認識する細胞	ヘルパーT細胞

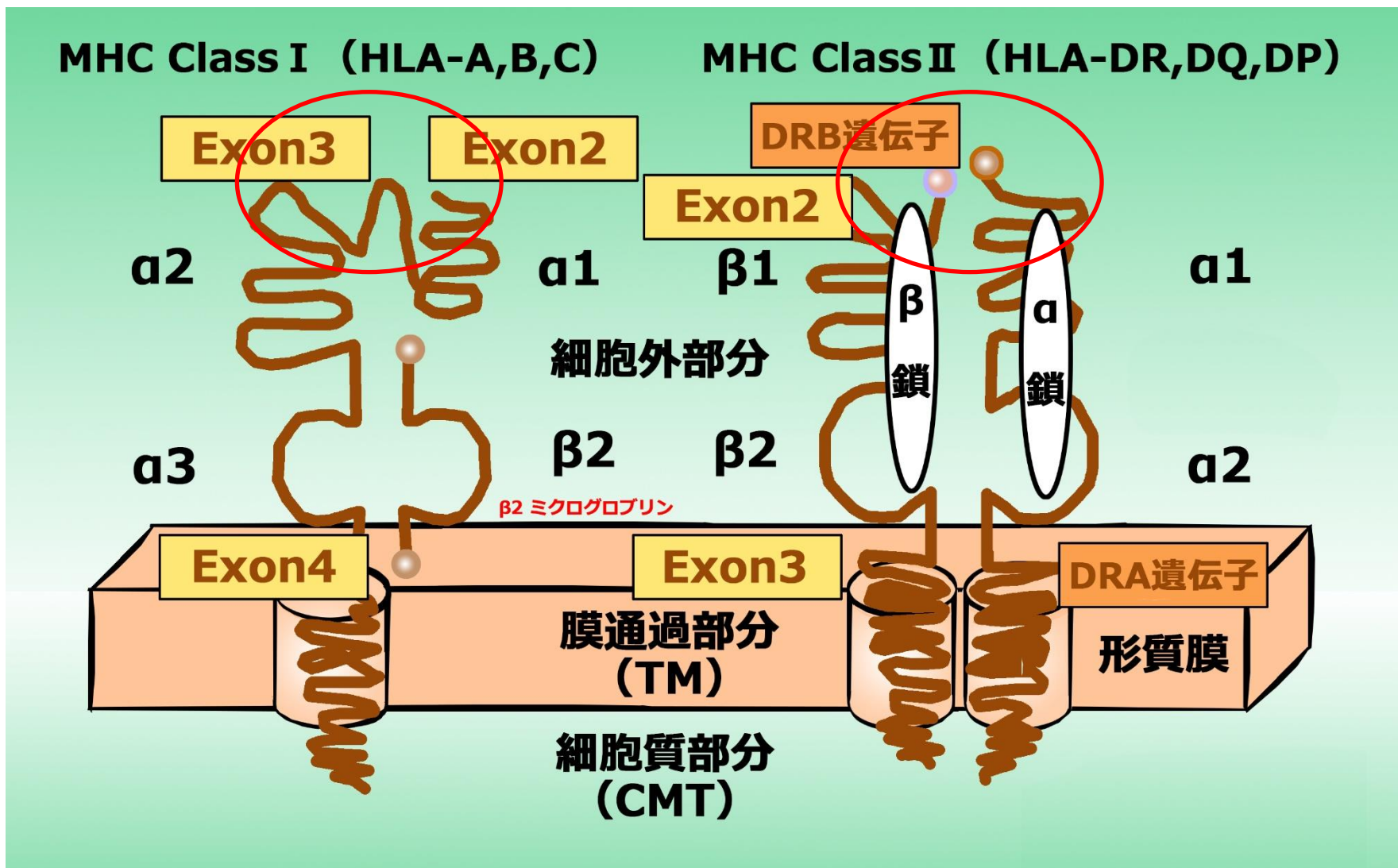
Class I: 内在性のたんぱく質(ペプチド)を提示



Class II: 外来性のたんぱく質(ペプチド)を提示



# 分子構造



# HLAタイピング (Class I)

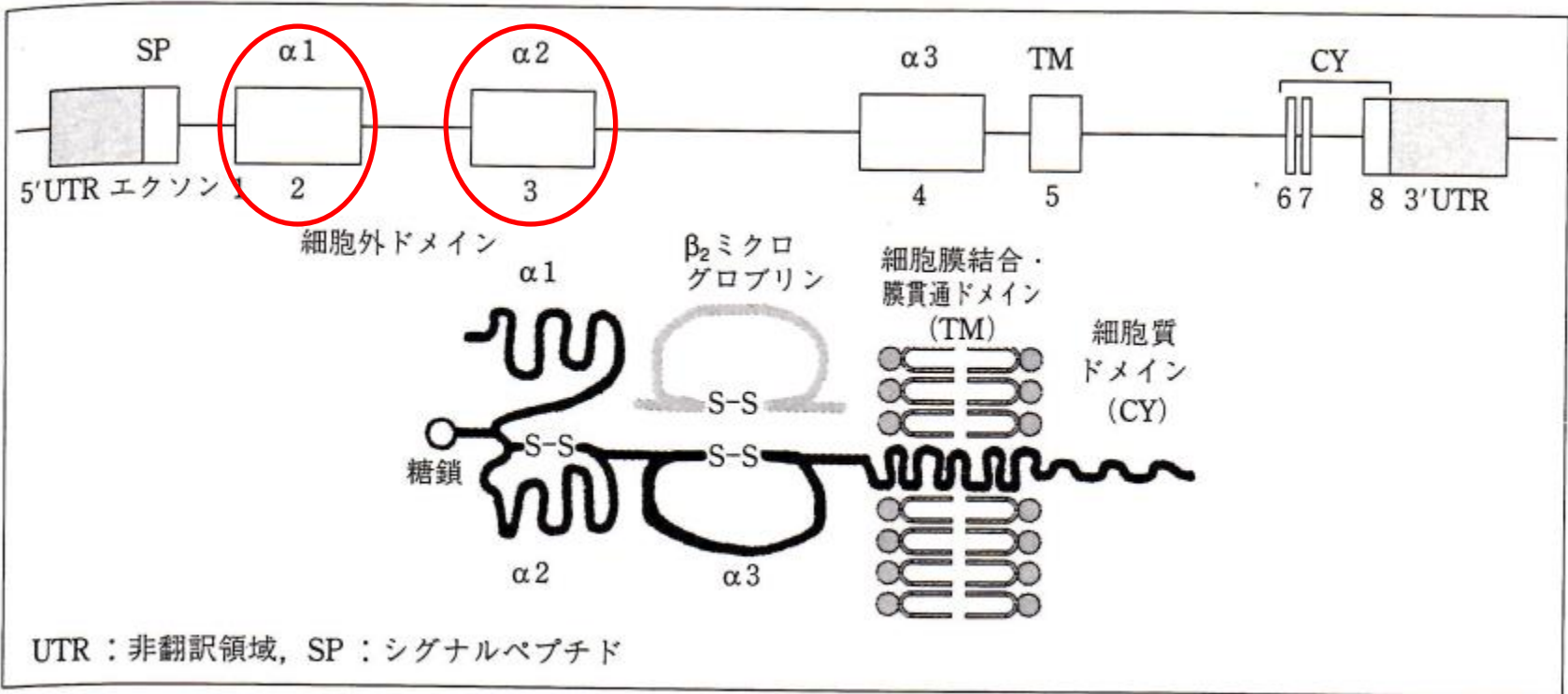
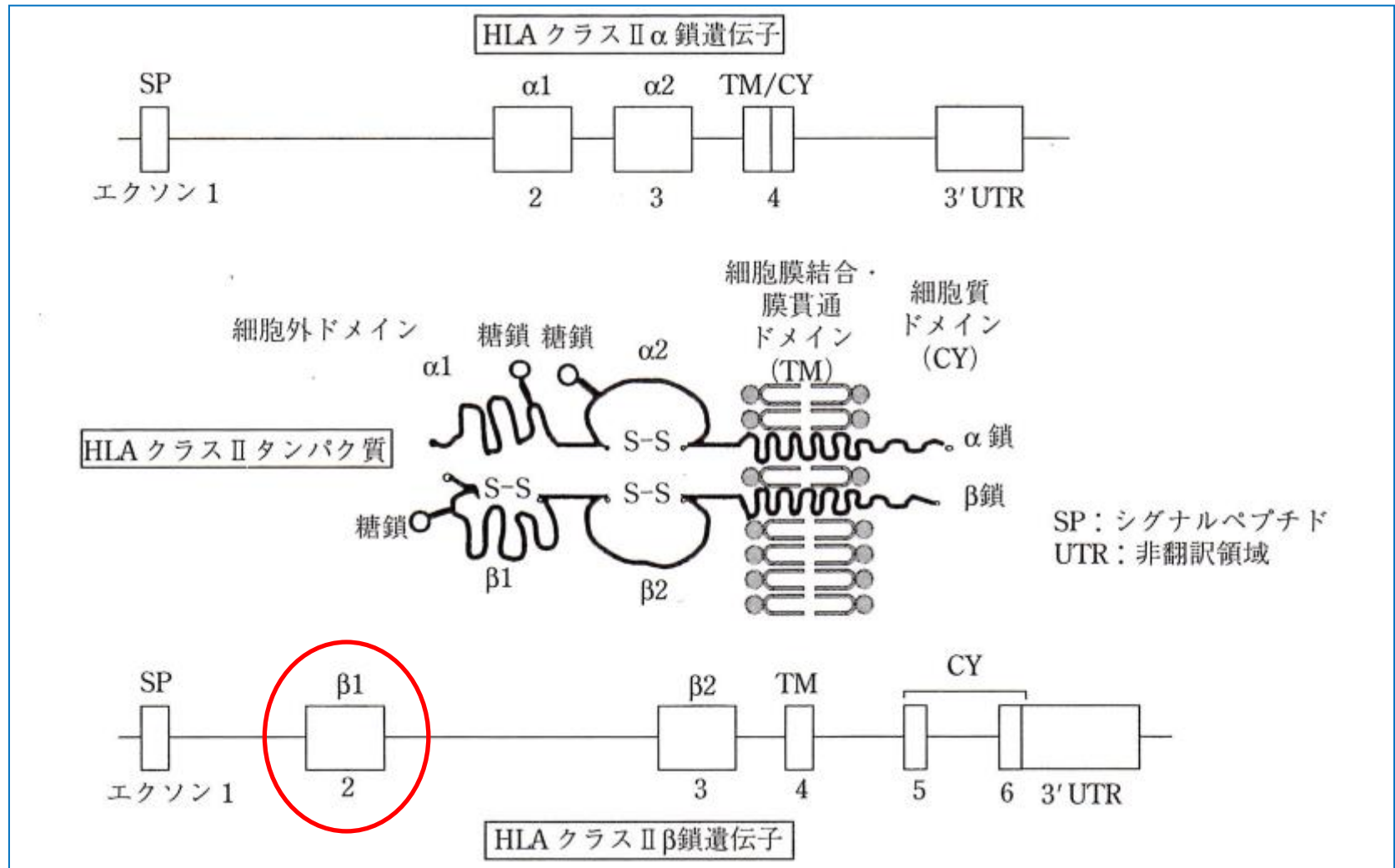


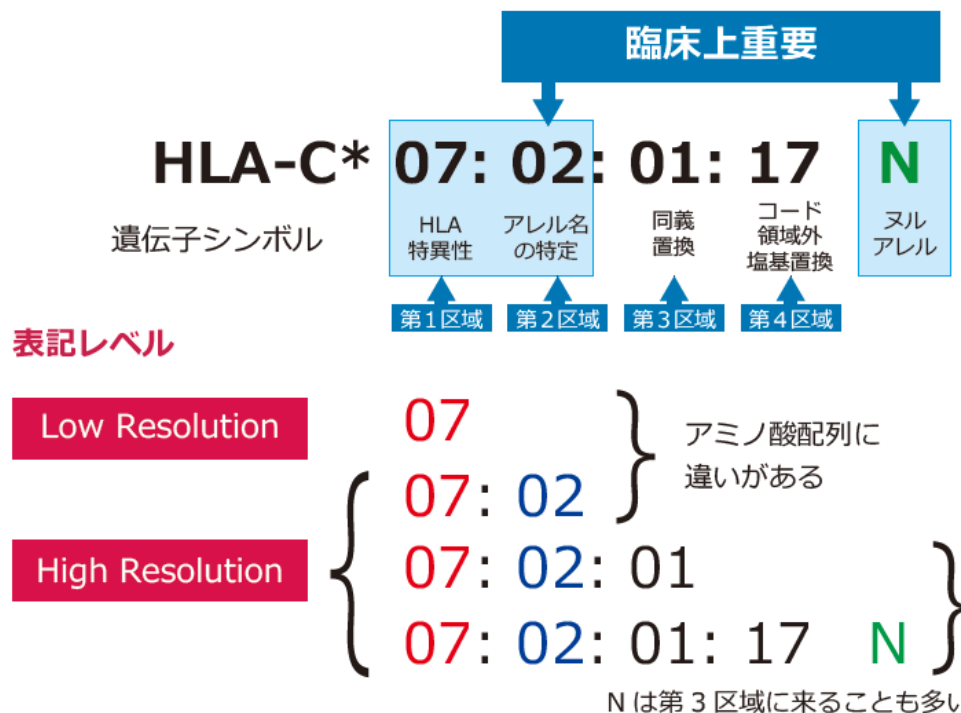
図 2.3 古典的 HLA クラス I 遺伝子構造と分子構造との関連性



# HLAタイピング (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

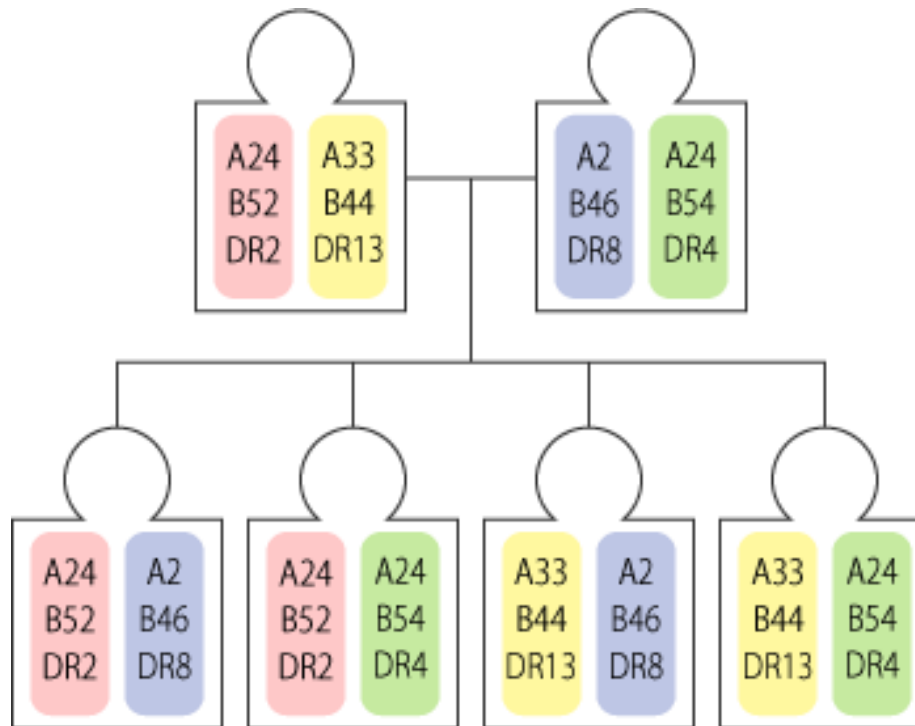
# HLAの特長①人種間差

	Allele	Japanese	African American	European Caucasian
1	A*24:02	36.1	2.5	8.4
2	A*02:01	11.4	11.5	27.5
3	A*02:06	9.2	0.1	0.1
4	A*11:01	9.0	1.4	6.0
5	A*31:01	8.6	1.0	2.7

- 人種により遺伝子頻度は大きく異なる
- 膨大なアレルから頻度を参考に同定
  - 検体(人種)によってフィルタを変える必要

# 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

		DQB1																DRB1			
		DQB1*05:01	DQB1*05:02	DQB1*05:03	DQB1*06:01	DQB1*06:02	DQB1*06:04	DQB1*06:09	DQB1*02:01	DQB1*02:02	DQB1*03:01	DQB1*03:02	DQB1*03:03	DQB1*04:01	DQB1*04:02						
DRB1	DQA1																				
	DRB345	DQA1*01:01	DQA1*01:05	DQA1*01:02	DQA1*01:04	DQA1*01:03	DQA1*01:02	DQA1*05:01	DQA1*02:01	DQA1*02:02	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	
DRB1*01:01	(Blank)	■																			DRB1*01:01
DRB1*10:01	(Blank)	■																			DRB1*10:01
DRB1*08:02	(Blank)																			■	DRB1*08:02
DRB1*08:03	(Blank)																			■	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	(Blank)																				DRB1*13:01
DRB1*12:01	DRB3*01:01																				DRB1*12:01
DRB1*14:03	DRB3*01:01																				DRB1*14:03
DRB1*14:12	DRB3*01:01																				DRB1*14:12
DRB1*03:01	(Blank)																				DRB1*03:01
DRB1*11:01	(Blank)																				DRB1*11:01
DRB1*13:07	DRB3*02:02																				DRB1*13:07
DRB1*14:06	DRB3*02:02																				DRB1*14:06
DRB1*14:54	DRB3*02:02																				DRB1*14:54
DRB1*14:07	DRB3*02:02																				DRB1*14:07
DRB1*14:05	DRB3*02:02																				DRB1*14:05
DRB1*12:02	DRB3*03:01																				DRB1*12:02
DRB1*13:02	DRB3*03:01																				DRB1*13:02
DRB1*04:01	DRB4*01:02																				DRB1*04:01
DRB1*04:05	DRB4*01:02																				DRB1*04:05
DRB1*04:10	DRB4*01:02																				DRB1*04:10
DRB1*04:03	DRB4*01:03																				DRB1*04:03
DRB1*04:06	DRB4*01:03																				DRB1*04:06
DRB1*04:07	DRB4*01:03																				DRB1*04:07
DRB1*07:01	DRB4*01:03																				DRB1*07:01
DRB1*09:01	DRB4*01:03																				DRB1*09:01

(HLA検査に必要なHLAの基礎知識 中島様講演会資料)

## HLA Class II DR 領域の遺伝子地図

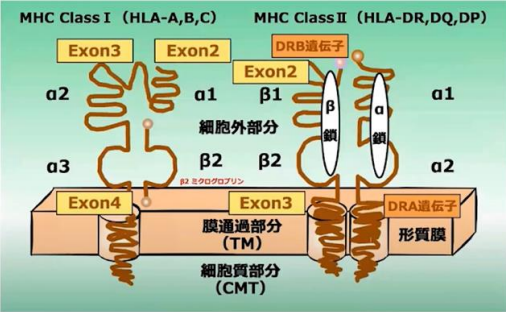




■ 発現遺伝子    ■ 偽遺伝子

# 動画のご紹介 -HLAとは

- 本年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/suguyakuHLA1\\_1.html](https://www.veritastk.co.jp/products/reference_detail/suguyakuHLA1_1.html)

すぐに役立つHLA【 Vol.1 HLA入門 】  
Part 1 HLAとは



MHC Class I (HLA-A, B, C)    MHC Class II (HLA-DR, DQ, DP)

Exon3    Exon2    DRB遺伝子

α2    α1    β1    α1

細胞外部分

α3    β2    β2    α2

Exon4    Exon3    DRA遺伝子

膜通過部分 (TM)    形質膜

細胞質部分 (CMT)

2022年4月27日開催

# SSP法の原理

# HLAタイピング検査法





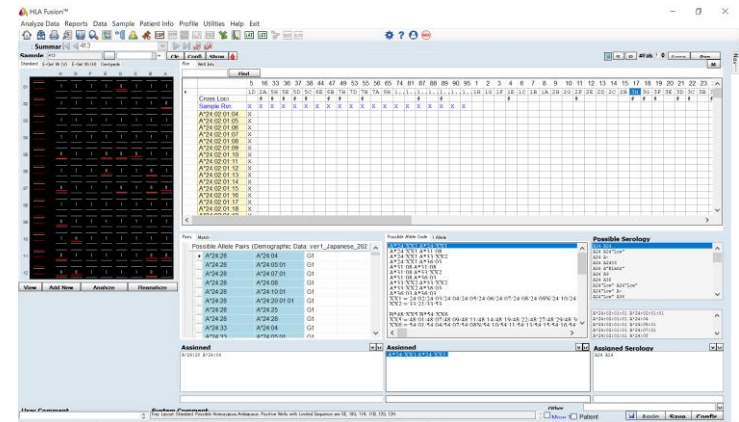
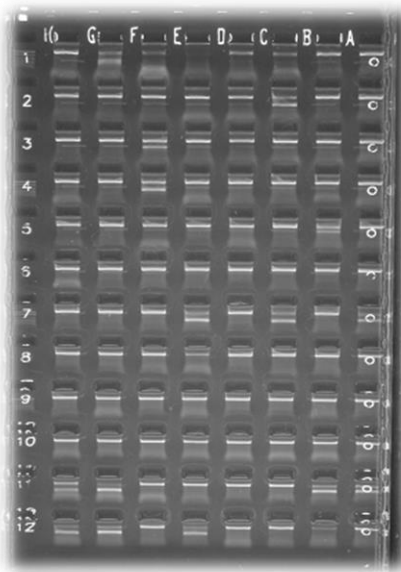
# SSP(Sequence Specific Primer)法

DNA抽出

PCR

電気泳動

解析

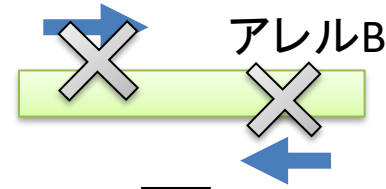
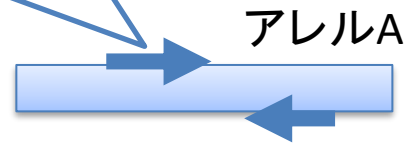


# SSP法とは

## Sequence Specific Primers

- アレルの配列に特異的に結合するプライマーを用いPCR増幅
  - 通常100-300 bp (塩基対)程度を増幅
- PCR増幅産物の有無でアレルの判定を行う

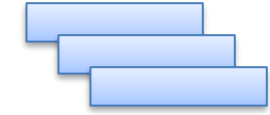
アレルA特異的プライマー



PCR

一部が増幅

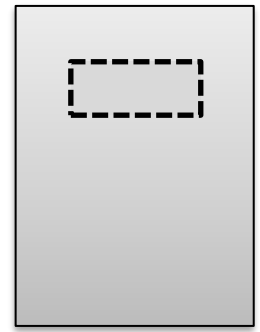
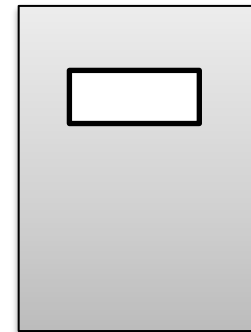
増幅せず



電気泳動

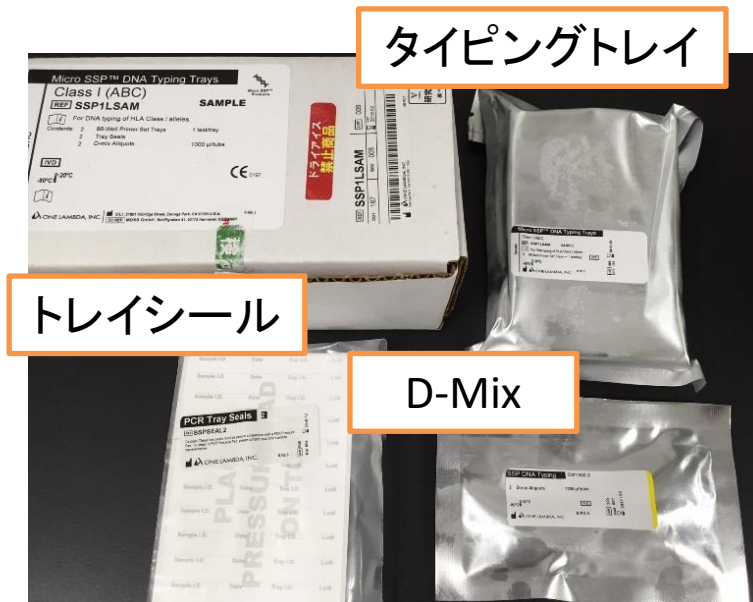
バンドあり

バンドなし



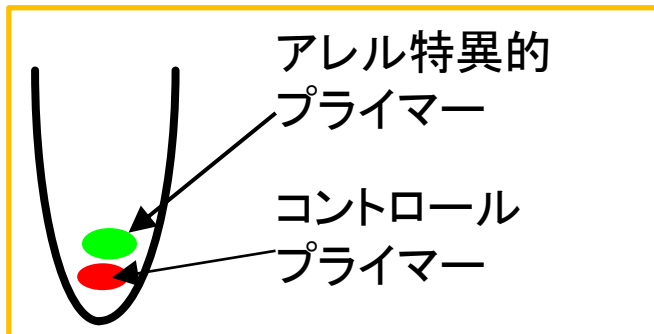
# マイクロSSPのキット構成

- D-Mix溶液
  - 検体DNAを加えてタイピングトレイに充填する
- タイピングトレイ
  - 検体を加えてサーマルサイクラーでPCR増幅
- トレイシール



# タイピングトレイ

- 各ウェルに2種類のプライマーが含まれる
  - コントロールプライマー
    - 検体DNAに必ず含まれる遺伝子を増幅
  - アレル特異的プライマー
    - 特定の配列を増幅
    - 同じ配列をもつアレルは全て増幅する



## Worksheetの例

Tray Pos.	Alleles Specificity
H	A*24:309; A*32:39; B*15:16:01:01~17:07 /24:01~24:02 /67 /87 /157 /162 /168 /177 /196 /208 /216 /222 /230 /254 /268 /273 /356 /361~362 /396 /403 /408 /411 /423~424 /442 /446 /500 /516 /523 /532 /546Q /550 /555 /575N /586 /602~603 /613 /619; B*27:02:01:01~02:04 /02:06 /30 /53 /57 /62 /65N /75 /77 /83 /95 /102 /119 /126 /134 /163 /171~172 /176N /181 /188 /197 /203 /213 /232 /236 /245~246N /251; B*37:34; B*38:25; B*40:13 /19 /109 /117 /292 /340 /394; B*41:46 /60; B*44:18:01:01~18:01:02 /25 /50:01~50:03 /95 /355; B*48:18; B*49:01:01:01~01:23 /03~25 /27~62 /64~66 /68~69 /71~78; B*51:231 /310; B*52:01:01:01~01:28 /01:30~19 /21:01~72 /74~109; B*53:17:01~17:02 /28; B*57:128; B*58:100
3	

# PCR反応

- Taqポリメラーゼ（酵素）を使ってDNAの一部を増幅する

- PCRの3ステップ

- ①変性（Denaturation）

- DNAを1本鎖に

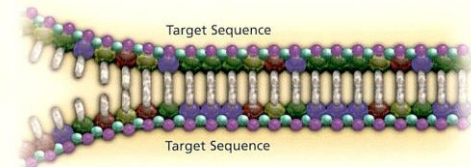
- ②アニーリング（Annealing）

- プライマーの結合

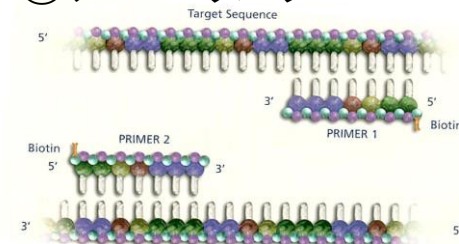
- ③伸長（Extension）

- 2本鎖の合成

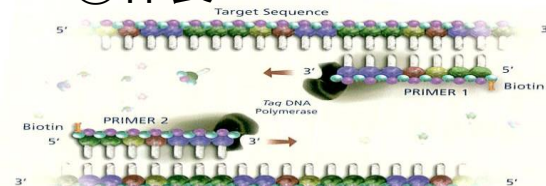
## ①変性



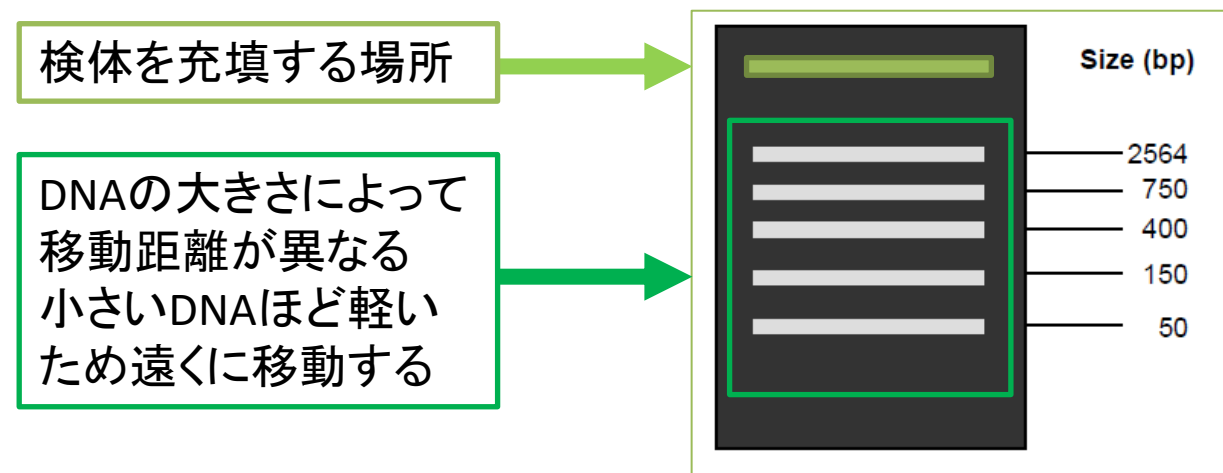
## ②アニーリング



## ③伸長



- 溶液に電流を流すことにより溶液中の電荷をもった物質を移動し、物質の大きさにより分析する方法
  - DNAは電圧をかけることによって移動する性質があるため、移動距離の違いによって分離する



# マイクロSSPシリーズ商品

## Genericトレー（抗原レベル・2桁）

- ABC/DRDQ JPN
- AB/DR kit
- HLA A Typing Kit
- Class I Generic Typing Kit など

## High resolution トレー（4桁レベル）

- Class II High Res. DRB Typing Kit など

キット構成は全て同じ

- タイピングトレイ
- D-Mix
- トレイシール



# キット以外に必要な試薬、器具

種類	商品名	メーカー
サーマルサイクラー	GeneAmp PCR System 9700シリーズ (アルミヘッドは不可) 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
PCRポリメラーゼ	AmpliTaq DNA Polymerase Goldは不可	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) N8080160
電気泳動装置	マイクロSSP用泳動槽	ベリタス (One Lambda) OLI-MGS108
	パワーサプライ(150V用)	メーカー不問
ゲル作成機器	ゲル作成用電子レンジ	メーカー不問
電気泳動用試薬	SeaKem LE Agarose	ロンザジャパン 50000
	エチジウムブロマイド	メーカー不問
	マイクロSSP サイズマーカー	ベリタス (One Lambda) SSP-SM
	10 × TBE	メーカー不問



# 手技のポイント

# マイクロSSPの操作ステップ

DNAの抽出



DNAと試薬の混合



トレーへのアプライ



PCR



電気泳動

# 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

## 抗凝固剤の種類

ACD推奨、  
EDTA可

ヘパリン不可

## 希釈溶媒

滅菌蒸留水を  
推奨

EDTA含有  
バッファーは  
非推奨

## 濃度とOD値

適正は  
100 ng/ $\mu$ L $\sim$

OD260/280:  
1.6 $\sim$ 1.8

# PCRに用いるDNA量

酵素反応に最適な量を使用

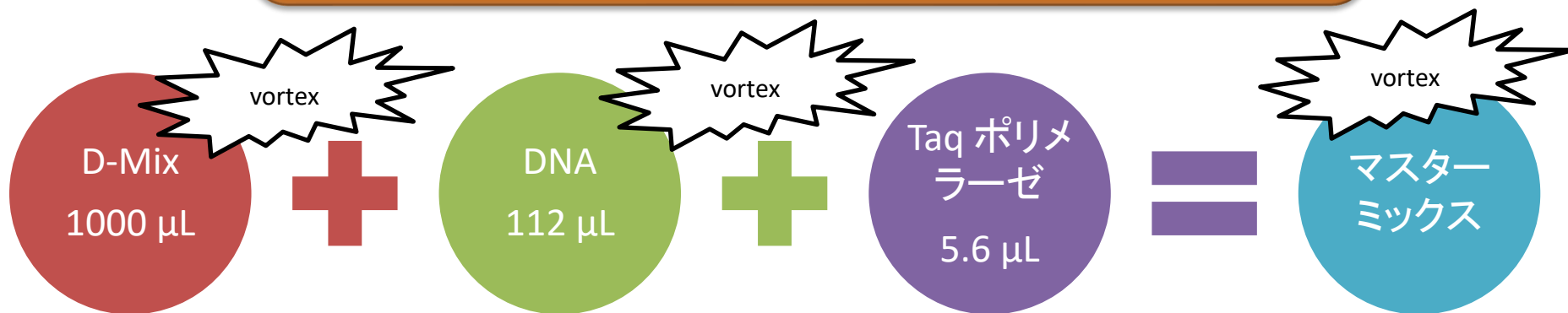
↑  
非特異増幅

JPNの場合 : 75-150 ng/ $\mu$ L  
JPN以外の場合 : 25-200 ng/ $\mu$ L  
(100 ng / $\mu$ Lが最適)

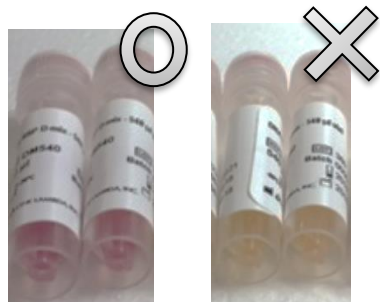
↓  
増幅不良

# DNAとD-Mix、ポリメラーゼの混合

D-Mixの状態を確認  
ポリメラーゼは正確な量を取る



- 室温に戻してからvortex
- 黄色になった試薬は使用不可



JPN以外の試薬はNC Wellがあります。D-MixにDNAを加える前にNC Well用のサンプル調整を行ってください。

【NC サンプル】

DNAの溶解に用いた滅菌精製水1  $\mu$ L + D-Mix 9  $\mu$ L

- AmpliTaq Goldは不可
- ポリメラーゼはvortex不可
- 過剰量取らない  
→PCR増幅不良につながる



# トレイへの検体の添加

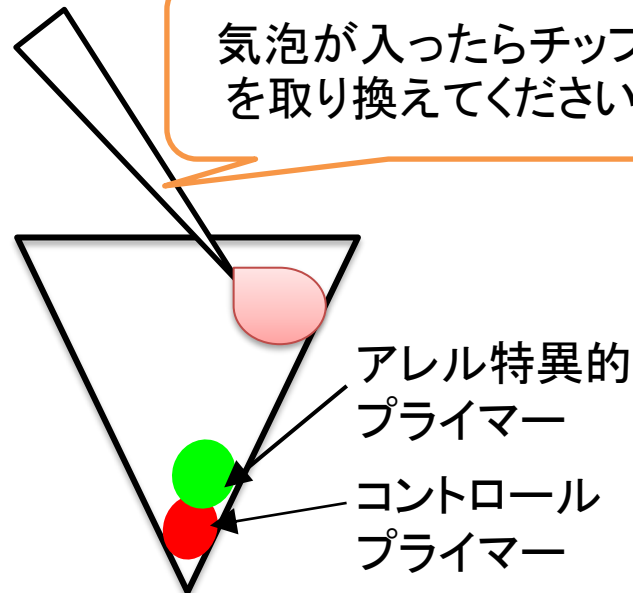
ウェルへの添加は壁面上部から  
シールをしっかりと貼る

- トレイを室温に戻し、マスターミックスを各ウェルに10  $\mu$ Lずつ添加
- トレイにキット付属のシールを貼る

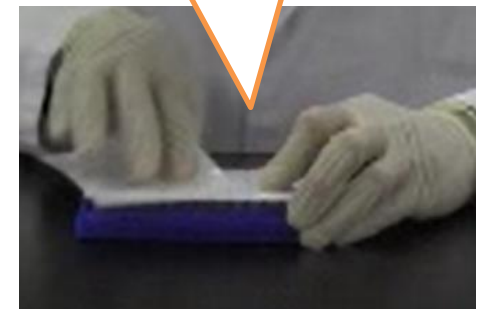
剥がしたシールは保存  
をお勧めします



気泡が入ったらチップ  
を取り換えてください



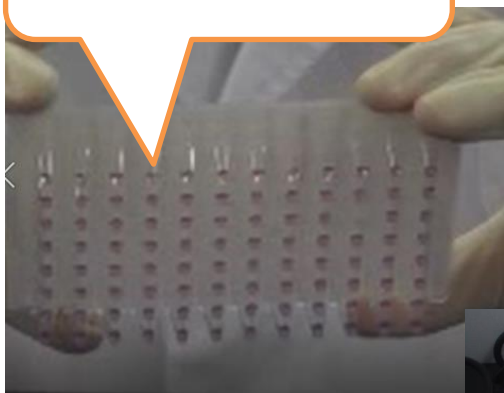
蒸発しないよう  
しっかりシール



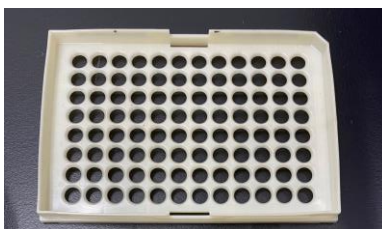
# PCR (約85分)

プラスチックトレイ、パッドでしっかり固定  
9600モードを使用

試薬がウェル底に  
あることを確認



パッド&トレイで  
蒸発防止



PCR条件 (Reaction volumeは10  $\mu$ L)

温度	時間	サイクル数
96°C	130 sec	1 cycle
63°C	60 sec	
96°C	10 sec	9 cycles
63°C	60 sec	
96°C	10 sec	20 cycles
59°C	50 sec	
72°C	30 sec	
4°C		$\infty$

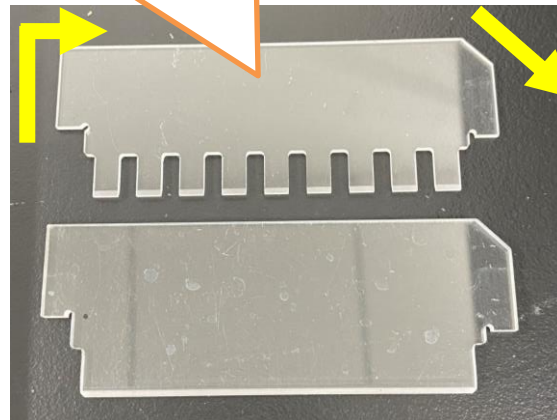
# ゲルボックスの準備

- ゲルボックスをベースにはめ、ねじで固定
- 水準器でベースが水平であることを確認
- コームをコームホルダーにセット



傾きは黒いねじ  
(3か所)で調整

上: ウェル用コーム(12枚)  
下: 電極用コーム(両端2枚)  
片側に斜めの切れ込み



手前側(赤)から見て  
右に切り込み



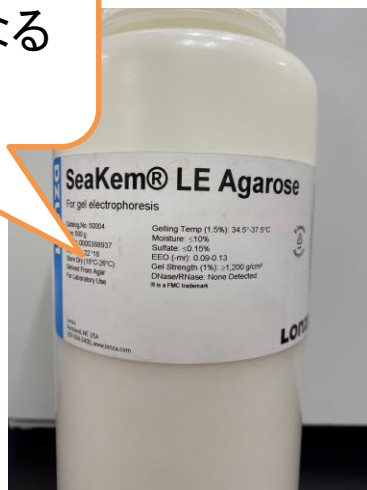


# ゲルの作製①

ゲルは用事調製  
アガロース溶解はしっかり(ただし加熱しすぎない)

- Seakem LEアガロース 0.75 g + 1 x TBE 35 mLを加熱
- 10 mg/mL エチジウムブロマイド 2  $\mu$ Lを添加

推奨品以外は  
バンドが不鮮明になる  
可能性



アガロースの結晶  
(キラキラしたもの)が  
溶けるまで混合



# ゲルの作製②

- ゲルをボックスに注ぎコームを挿し15分放置
- ゲルが固まった後1 x TBE 10 mLの一部を注ぎコームを外す
- 残りの1 x TBEを注ぐ(ゲル全体に行き渡るまで注ぐ)



泡立えないように  
ゆっくり

コームの向き  
に注意



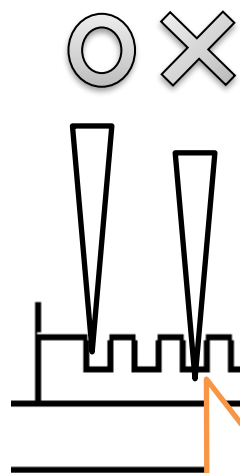
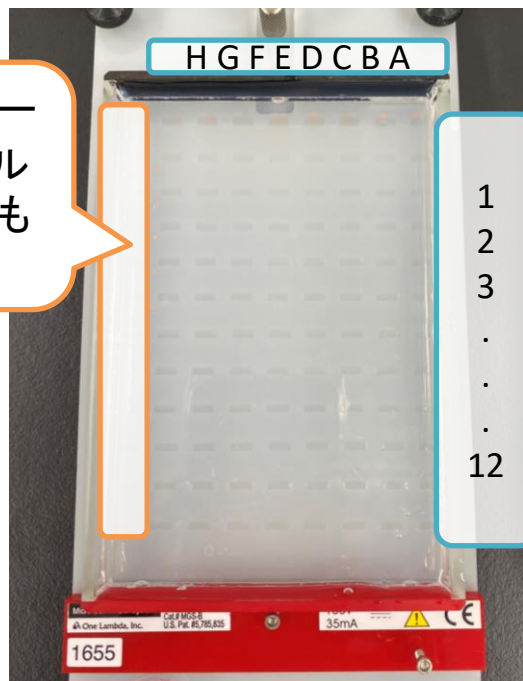
バッファーは  
ゲル上部を  
覆うように

# PCR増幅産物のゲルへの添加

アプライは8連ピペットでスムーズに入れる位置と量をチェック

- PCR増幅産物およびサイズマーカーを10 uLずつ添加

サイズマーカー  
(全てのウェル  
に入れなくても  
よい)



チップは深く  
入れすぎない

時間が経つとサンプルが  
拡散しバンドが薄くなります



# 電気泳動、撮影

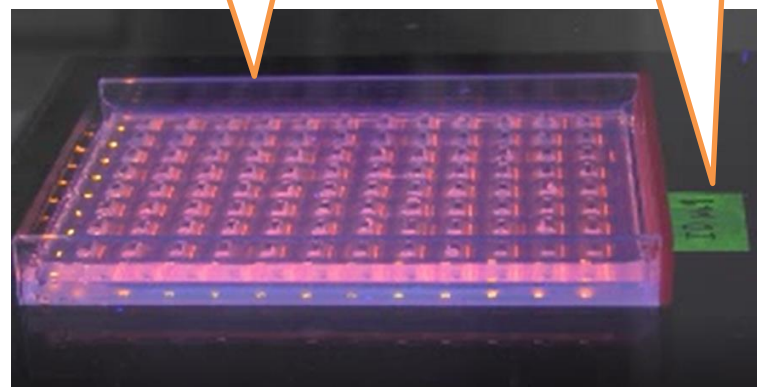
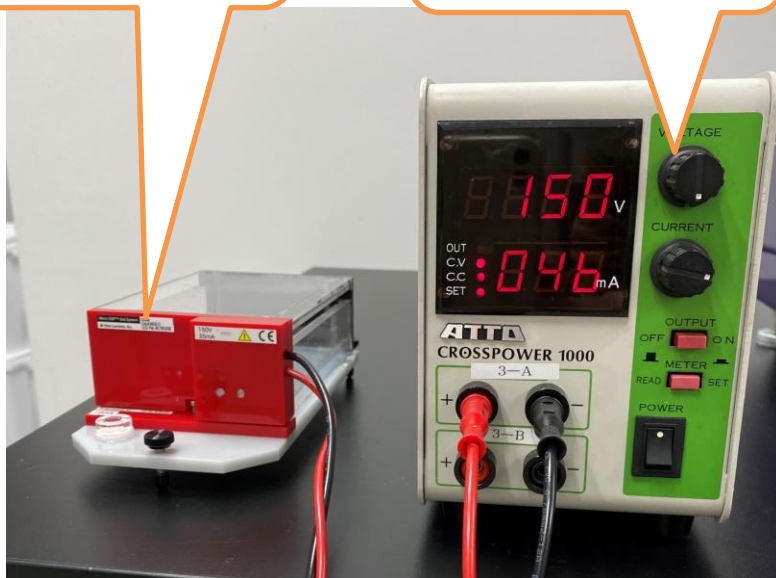
泳動は規定条件と時間で  
写真撮影は真上から、ピントを合わせて

蓋の向き  
(手前が赤)

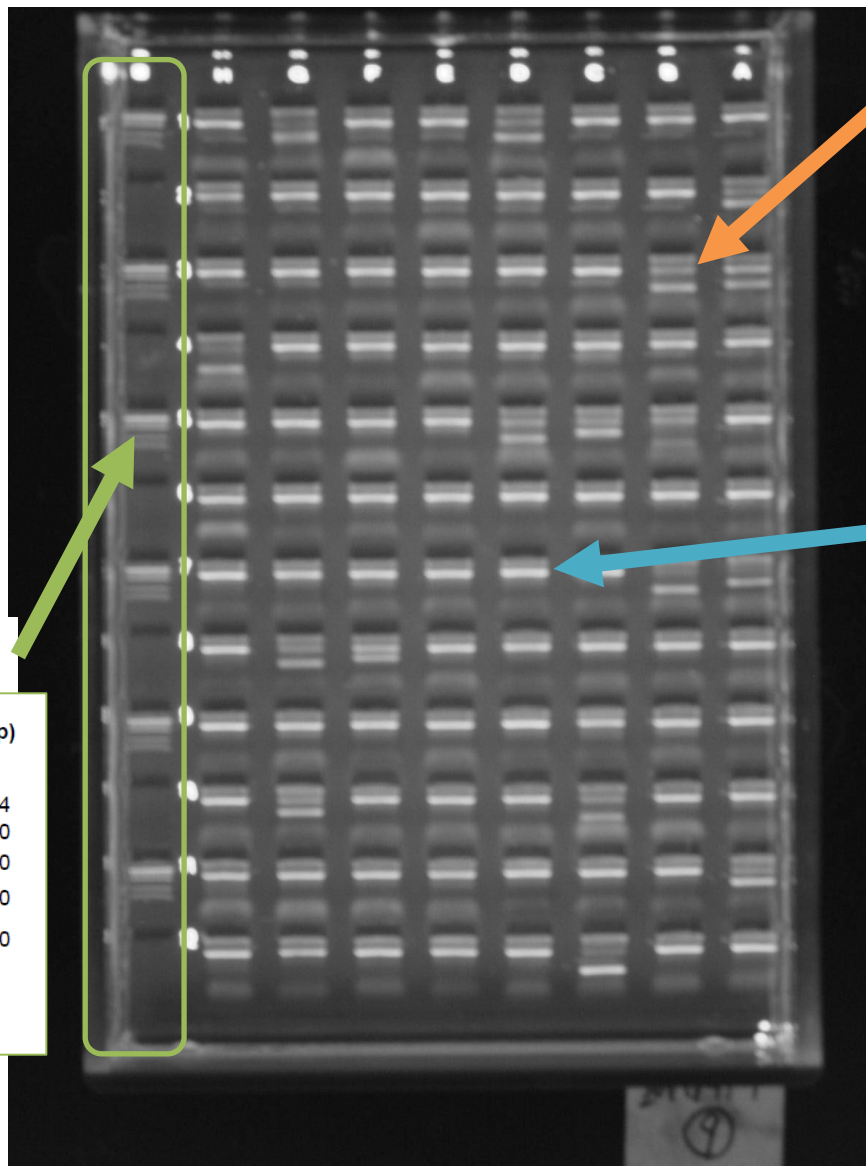
150 V、3分

ゲルボックスに  
入れたままで  
OK

サンプルラベル  
も同時に撮影



# ゲル画像の例



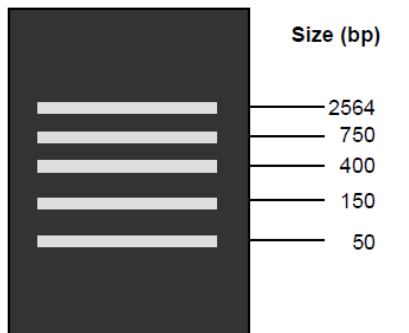
## 陽性ウェル

- コントロールバンドよりも下にアレルバンドがある
- コントロールバンドは薄いか確認できない

## 陰性ウェル

- コントロールバンドのみ

## サイズマーカー



# 動画のご紹介 – マイクロSSPハンズオン

- マニュアル動画が公開中です

[https://www.veritastk.co.jp/products/reference\\_detail/hlaprotcol-microssp.html](https://www.veritastk.co.jp/products/reference_detail/hlaprotcol-microssp.html)



# 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。

