

INNO-LiPA 使用方法 (PCR調製編)

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認ください。

内容:

コード No.	品名	梱包単位	保存温度	輸送温度
IG-80332	INNO-LiPA HLA-A Update	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20°C)	冷蔵/冷凍(-20°C)
IG-80634	INNO-LiPA HLA-B Update Plus	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20°C)	冷蔵/冷凍(-20°C)
IG-80342	INNO-LiPA HLA-C	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20°C)	冷蔵/冷凍(-20°C)
IG-80344	INNO-LiPA HLA-DPB	20 Tests	冷蔵(4°C)	冷蔵(4°C)
IG-80703	INNO-LiPA HLA-DQA1	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20°C)	冷蔵/冷凍(-20°C)
IG-80336	INNO-LiPA HLA-DQB1 Update	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20°C)	冷蔵/冷凍(-20°C)
IG-80340	INNO-LiPA HLA-DRB decoder	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20°C)	冷蔵/冷凍(-20°C)
IG-80635	INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus	20 Tests	冷蔵/冷凍(-20°C)	冷蔵/冷凍(-20°C)

必要な試薬:

- INNO-LiPA HLA-DPBのみ *Taq* DNA polymeraseが添付されていないため、別途ご購入ください。
Ampli*Taq* DNA polymerase (Applied Biosystems) を推奨します。

1. 準備:

- 使用前に、サーマルサイクラーのプログラム調節を行ってください。このプロトコールは、Gene Amp™ PCRチューブ (0.5 mL)とPE-480サーマルサイクラー、またはMicro Amp™ PCRチューブ (0.2 mL)とPE-9700サーマルサイクラーで最適に増幅されるようにデザインされています。
- PCRサンプルを調製する前に、サーマルサイクラーの電源を入れヒートブロックを予め温めて(95°C)おき、直ちにPCRサイクルを開始できるようにします。

2. 操作方法:

2.1 PCRの調製

2.1.1 INNO-LiPA HLA-A Multiplex

- バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスします (特にLiPA-*Taq*)。
 - ◇ HLA-A Amplification Buffer 0.3 mL (AB)
dNTPs、0.05%NaN₃が入った黄色キャップのチューブ
 - ◇ HLA- A Primer Solution 0.3 mL (HLA-A)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05% NaN₃が入った桃色キャップのチューブ
 - ◇ LiPA-*Taq* 35 μL (LT)
Taq DNA polymerase (2U/μL)、0.05% NaN₃が入った紫色のキャップのチューブ
- Genomic DNAを0.02~1.5 μg/μLの濃度になるようにTE bufferまたは滅菌蒸留水で希釈します。純度は (A260/A280) が1.5以上のDNAを使用します。
- 必要なバイアルの数 (N) を決めます。 :
DNAサンプル数 (N) + 1 (陰性コントロール : DNAを添加しない) + 1
オートクレーブ滅菌した1.5 mLチューブに、フィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製します。この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 μL) です。

23.75 μL	× N	オートクレーブ済蒸留水	
10 μL	× N	Amplification buffer	(AB: 黄色キャップ)
10 μL	× N	HLA- A Primer Solution	(HLA- A: 桃色キャップ)
1.25 μL	× N	LiPA- <i>Taq</i>	(LT: 紫色キャップ)
- 優しくボルテックスにかけ、PCRチューブにマスターミックスを45 μLずつ小分けします。
- 調製したGenomic DNA 5 μL (0.1~7.5 μg) をピペットで添加します。必要ならば (例・PE-480を使用する場合)、各チューブにミネラルオイルを2滴 (≒ 40μL) ずつ添加します。また、陰性コントロールチューブに蒸留水 (DNA無し) 5 μLを添加します。
- 合計50 μLのDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーへ入れます。

2.1.2 INNO-LiPA HLA B Multiplex Plus

- バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスします (特にLiPA-Taq)。
 - ◇ HLA-B Amplification Buffer 0.3 mL (AB)
dNTPs、0.05% NaN₃ が入った黄色キャップのチューブ
 - ◇ HLA-B Primer Solution 0.3 mL (HLA-B)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05 % NaN₃ が入った緑色キャップのチューブ
 - ◇ LiPA-Taq 35 μL (LT)
Taq DNA polymerase (2U/μL)、0.05 % NaN₃ が入った紫色キャップ のチューブ
 - ◇ HLA-Bw4 Primer Solution 0.07 mL (HLA-Bw4; HLA-B)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05 % NaN₃ が入った赤色キャップのチューブ
- Genomic DNAを0.02~1.5 μg/μLの濃度になるようにTE bufferまたは滅菌蒸留水で希釈します。
純度は (A260/A280) が1.5以上のDNAを使用します。
- 必要なバイアルの数 (N) を決めます。 :
N = DNAサンプル数 + 1 (陰性コントロール : DNAを添加しない) + 1
オートクレーブ滅菌した1.5 mLチューブに、フィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製します。この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 μL) です。

23.75 μL	× N	オートクレーブ済蒸留水	
10 μL	× N	Amplification buffer	(AB: 黄色キャップ)
10 μL	× N	HLA-B Primer Solution	(HLA-B: 緑色キャップ)
		またはHLA-Bw4 Primer Solution	またはBw4: 赤キャップ)
1.25 μL	× N	LiPA-Taq	(LT: 紫色キャップ)
- 優しくボルテックスにかけ、PCRチューブにマスターミックスを45 μLずつ分注します。
- 調製したGenomic DNA 5 μL (0.1~7.5 μg) をピペットで添加します。必要ならば (例・PE-480を使用する場合)、各チューブにミネラルオイルを2滴 (≒ 40 μL) ずつ添加します。陰性コントロールチューブに蒸留水 (DNA無し) 5 μLを添加します。
- 合計50 μLのDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーへ入れます。

2.1.3 INNO-LiPA HLA-C Multiplex

- バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスします。(特にLiPA-Taq)。
 - ◇ HLA-C Amplification Buffer 0.3 mL (AB)
dNTPs、0.05 % NaN₃が入った黄色キャップのチューブ
 - ◇ HLA-C Primer Solution 0.3 mL (HLA-B)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05 % NaN₃が入った青色キャップのチューブ
 - ◇ LiPA-Taq 35 μL (LT)
Taq DNA polymerase (2U/μL)、0.05 % NaN₃が入った紫色キャップのチューブ
- Genomic DNAを0.01~0.25 μg/μLの濃度になるようにTE bufferまたは滅菌蒸留水で希釈します。
純度は (A260/A280) が1.5以上のDNAを使用します。
- 必要なバイアルの数 (N) を決めます。 :
N = DNAサンプル数 + 1 (陰性コントロール ; DNAを添加しない) + 1
オートクレーブ滅菌した1.5 mLチューブにフィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製します。この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 μL) です。

23.75 μL	× N	オートクレーブ済蒸留水	
10 μL	× N	Amplification buffer	(AB: 黄色キャップ)
10 μL	× N	HLA-C Primer Solution	(HLA-C: 青色キャップ)
1.25 μL	× N	LiPA-Taq	(LT: 紫色キャップ)
- 優しくボルテックスにかけ、PCR チューブにマスターミックスを 45 μL ずつ分注します。
- 調製した Genomic DNA 5 μL (0.1~7.5 μg) をピペットで添加します。
必要ならば (例・PE-480 を使用する場合)、各チューブにミネラルオイルを 2 滴 (≒40 μL) ずつ添加します。陰性コントロールチューブに蒸留水 (DNA 無し) 5 μL を添加します。
- 合計50 μLのDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーへ入れます。

2.1.4 INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus

- バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスします (特にLiPA-*Taq*)。
 - ◇ DRB Amplification Buffer 0.3 mL (AB)
dNTPs、0.05 % NaN₃が入った透明キャップのチューブ
 - ◇ DRB1 Primer Solution 0.3 mL (DRB1)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、防腐剤として0.05%NaN₃が入った黄色キャップのチューブ
 - ◇ LiPA-*Taq* 35 μL (LT)
Taq DNA polymerase (2U/μL)、0.05%NaN₃が入った紫色キャップ のチューブ
 - ◇ DRB1*03, 11, 13, 14 Primer Solution
ビオチン化プライマー、MgCl₂、防腐剤として0.05%NaN₃を含みます。
使用する前に完全に溶かしてください。
- Genomic DNAを0.01 μg/μL以上の濃度になるようにTE bufferまたは滅菌蒸留水で希釈します。
純度は (A260/A280) が1.5以上のDNAを使用します。
- 必要なバイアルの数(N)を決めます。 :
$$N = \text{DNAサンプル数} + 1 (\text{陰性コントロール ; DNAを添加しない}) + 1$$

オートクレーブ滅菌した1.5 mLチューブにフィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製します。この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 μL) です。

24 μL	× N	オートクレーブ済蒸留水	
10 μL	× N	Amplification buffer	(AB: 透明キャップ)
10 μL	× N	HLA- DRB1 Primer Solution	(HLA- DRB1: 黄色キャップ
		またはDRB1*03,11,13,14	またはDRB1*03,11,13,14: 青色キャップ)
1 μL	× N	LiPA- <i>Taq</i>	(LT: 紫色キャップ)
- 優しくボルテックスにかけ、PCRチューブにマスターミックスを45 μLずつ分注します。
- 調製したGenomic DNA 5 μL (0.05~0.1 μg) をピペットで添加します。必要ならば(例・PE-480を使用する場合)、各チューブにミネラルオイルを2滴 (≒ 40 μL) ずつ添加します。陰性コントロールチューブに蒸留水(DNA無し) 5 μLを添加します。
- 合計50 μLのDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーへ入れます。

2.1.5 INNO-LiPA HLA-DRB decoder Amplification

- バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスします (特にLiPA-Taq)。
 - ◇ DRB Amplification Buffer 0.3 mL (AB)
dNTPs、0.05 % NaN₃が入った透明キャップのチューブ
 - ◇ DRB1 + 3 + 4 + 5 Primer Solution 0.3 mL (DRB1+ 3 + 4 + 5)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05%NaN₃が入ったオレンジ色のキャップのチューブ
(DRB1+ 3 + 4 + 5 alleleの第2エクソンを増幅します)
 - ◇ 86G Primer Solution 0.3 mL (86G)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05 % NaN₃が入った緑色のキャップのチューブ
(コドン86のアミノ酸配列がGまたはDを示すDRB alleleの第2エクソンを配列特異的に増幅)
 - ◇ 86V Primer Solution 0.3 mL (86V)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05 % NaN₃が入った茶色のキャップのチューブ
(コドン86のアミノ酸配列がVを示すDRB alleleの第2エクソンを配列特異的に増幅)
 - ◇ DRB1 Primer Solution 0.3 mL (DRB1)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05 % NaN₃が入った黄色のキャップのチューブ
(DRB1 アリルの第2エクソンを増幅)
 - ◇ LiPA-Taq 35 µL (LT)
Taq DNA polymerase (2U/µL)、0.05 % NaN₃が入った紫色のキャップのチューブ
- Genomic DNAを0.01 µg/µL以上の濃度になるようにTE bufferまたは滅菌蒸留水で希釈します。
純度は(A260/A280)が1.5以上のDNAを使用します。
- 必要なバイアルの数(N)を決めます。
N = DNAサンプルの数 + 1 (陰性コントロール ; DNAを添加しない) + 1
オートクレーブした1.5 mLチューブにフィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製します。いずれも、この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 µL) です。
 - ◇ DRB1+3+4+5、86Vサンプルの調製

24.5 µL	× N	オートクレーブ済蒸留水	
10 µL	× N	Amplification buffer	(AB: 透明キャップ)
10 µL	× N	Primer Solution (DRB1+3+4+5または86V)	(1+3+4+5: 橙色キャップ または86V: 茶色キャップ)
0.5 µL	× N	LiPA-Taq	(LT: 紫色キャップ)
 - ◇ DRB1、86Gサンプルの調製

24 µL	× N	オートクレーブ済蒸留水	
10 µL	× N	Amplification buffer	(AB: 透明キャップ)
10 µL	× N	Primer Solution (86GまたはDRB1)	(86G: 緑色キャップ またはDRB1: 黄色キャップ)
1 µL	× N	LiPA-Taq	(LT: 紫色キャップ)
- 優しくボルテックスにかけ、PCRチューブにマスターミックスを45 µLずつ分注します。
- 調製したGenomic DNA 5 µL (0.05~0.1 µg) をピペットで添加します。必要ならば(例・PE-480を使用する場合)、各チューブにミネラルオイルを2滴 (≒ 40 µL) ずつ添加します。陰性コントロールチューブに蒸留水(DNA無し) 5 µLを添加します。
- 合計50 µLのDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーへ入れます。

2.1.6 INNO-LiPA HLA-DQB1 Multiplex

- バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスします。(特にLiPA-Taq)。
 - ◇ DQB1 Amplification Buffer 0.3 mL (AB)
dNTPs、0.05 % NaN₃が入った透明キャップのチューブ
 - ◇ DQB1 Multiplex 0.3 mL (DQB1)
ビオチン化プライマー、MgCl₂、0.05 % NaN₃が入った緑色キャップのチューブ
 - ◇ LiPA-Taq 35 μL (LT)
Taq DNA polymerase (2U/μL)、0.05 % NaN₃が入った紫色キャップのチューブ
- Genomic DNAを0.02~1.5 μg/μLの濃度になるようにTE bufferまたは滅菌蒸留水で希釈します。
純度は(A260/A280)が1.5以上のDNAを使用します。
- 必要なバイアルの数(N)を決めます。 :
N = DNAサンプルの数 + 1 (陰性コントロール ; DNAを添加しない) + 1
オートクレーブした1.5 mLチューブにフィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製します。 いずれも、この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 μL) です。

24 μL	× N	オートクレーブ 済蒸留水	
10 μL	× N	Amplification buffer	(AB: 透明キャップ)
10 μL	× N	DQB1 Primer Solution	(HLA- DQB1: 緑色キャップ)
1 μL	× N	LiPA-Taq	(LT: 紫色キャップ)
- 優しくルテックスにかけ、PCRチューブにマスターミックスを45 μLずつ分注します。
- 調製したGenomic DNA 5 μL (0.1~7.5 μg) をピペットで添加します。必要ならば(例・PE-480を使用する場合)、各チューブにミネラルオイルを2滴 (≒40 μL) ずつ添加します。陰性コントロールチューブに蒸留水 (DNA無し) 5 μLを添加します。
- 合計50 μLのDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーへ入れます。

2.1.7 INNO-LiPA HLA-DPB Amplification

- バイアルを開く前に、試薬を軽くボルテックスします。
 - ◇ Taq DNA polymeraseが添付されておりませんので、別途ご購入ください。
Ampli Taq DNA polymerase (Applied Biosystems) をお勧めいたします。
 - ◇ DPB Amplification Buffer 3 mL (AB)
dNTPsと、防腐剤として0.05%NaN₃入った透明キャップのチューブ
 - ◇ DPB Primer Solution 0.3 mL (DPB1)
ビオチン化プライマー、0.05 % NaN₃ が入った黄色キャップのチューブ
 - ◇ MgCl₂ 3 mL
MgCl₂、0.05 % NaN₃が入った薄紫色キャップのチューブ
- Genomic DNAを0.02~0.1 µg/µLの濃度になるようにTE bufferまたは滅菌蒸留水で希釈します。
- 必要なバイアルの数(N)を決めます。：
$$N = \text{DNAサンプルの数} + 1 (\text{陰性コントロール ; DNAを添加しない}) + 1$$
- オートクレーブした1.5 mLチューブにフィルター付きピペットチップを用いてマスターミックスを調製します。この段階で増幅用混合液の量は (N × 45 µL) です。

14.8 µL	× N	オートクレーブ済蒸留水	
10 µL	× N	Amplification buffer	(AB: 透明キャップ)
10 µL	× N	DQB1 Primer Solution	(HLA- DQB1: 緑色キャップ)
10 µL	× N	MgCl ₂	(MgCl ₂ : 薄紫色キャップ)
0.2 µL	× N	LiPA-Taq	(LT: 紫色キャップ)
- 優しくルテックスにかけ、PCRチューブにマスターミックスを45 µLずつ分注します。
- 調製したGenomic DNA 5µL (0.05~0.1 µg) をピペットで添加します。必要ならば(例・PE-480を使用する場合)、各チューブにミネラルオイルを2滴 (≒40µL) ずつ添加します。陰性コントロールチューブに蒸留 (DNA無し) 5 µLを添加します。
- 合計50 µLのDNA+マスターミックス溶液をサーマルサイクラーへ入れます。

2.2 PCR反応条件

2.2.1 HLA- Class I amplification, DRB1, DRB1*03, 11, 13, 14の条件 (PE-9700)

	Step	Temp	Time	Cycle
1	Denature	96°C	5 min	
2	Denature	96°C	30 sec.	5 cycles
3	Anneal primers	64°C	50 sec.	
4	Extend primers	72°C	50 sec.	
5	Denature	96°C	30 sec.	5 cycles
6	Anneal primers	62°C	50 sec.	
7	Extend primers	72°C	50 sec.	
8	Denature	96°C	30 sec.	10 cycles
9	Anneal primers	60°C	50 sec.	
10	Extend primers	72°C	50 sec.	
11	Denature	96°C	30 sec.	15 cycles
12	Anneal primers	55°C	50 sec.	
13	Extend primers	72°C	50 sec.	
14	Elongate	72°C	10 min.	

* クラスIの反応条件は全て同一です。

2.2.2 DRB1, DRB decoder (DRB1+3+4+5, 86G, 86V) DQB1の条件 (PE-9700)

	Step	Temp	Time	Cycle
1	Denature	95°C	5 min	
2	Denature	95°C	20 sec.	35 cycles
3	Anneal primers	58°C	20 sec.	
4	Extend primers	72°C	20 sec.	
5	Elongate	72°C	10 min	

* DRB1、DRB decoder、DQB1の反応条件は同一です。

2.2.3 DPB の反応条件 (PE-9700)

	Step	Temp	Time	Cycle
1	Denature	96°C	5 min	
2	Denature	96°C	15 sec.	30 cycles
3	Anneal primers	55°C	20 sec.	
4	Extend primers	72°C	20 sec.	
5	Elongate	72°C	10 min	

増幅後のサンプルは直ちにテストを実施するか、または-15~-20°Cでサンプルを保存します。

注意：未反応の増幅用試薬と増幅したPCR産物は、一緒に保存しないで下さい。

2.2.4 増幅の確認

増幅産物の存在の有無を、2%アガロースゲル電気泳動により確認します。増幅産物10 μLをゲルにアプライし、下記のサイズに増幅産物のバンドが見られることを確認後次のステップに進みます。

- ◇ A578bp (exon1-2), 436bp (exon3), 377bp (exon4)
- ◇ B555bp (exon2), 436bp (exon3), 323bp (exon4)
- ◇ C904bp
- ◇ DRBおよびDRB1 decoder280bp
- ◇ DQB1261bp (exon2), 250bp (exon3)
- ◇ DPB280bp

注意事項

- 本製品は研究用試薬です。疾患の治療や診断の目的で使用することはできませんのでご注意ください。
- ロット番号の一致しないキットの試薬は混ぜないで下さい。
- 使用期限の切れた試薬は使用しないで下さい。
- キット試薬の物理的外観の変質は、試薬の不安定化や劣化を示しています。
- Amplification Buffer (AB)、各 Primer Solution と LiPA-Taq (LT)は、防腐剤としてアジ化ナトリウムを含んでいます。これらの溶液を飲み込むと有害です。非常に有害なガスの発生を防ぐため、酸と接触させないでください。配管中で爆発性の鉛アザイドや銅アザイドが形成されるのを防ぐため、アジ化ナトリウムを含む溶液を廃棄した後は水で配管をよく洗い流して下さい。
- サンプルは感染の可能性があるものとして取り扱って下さい。
- ヘパリン採血の全血サンプルは使用できません。
- DNA の混入を避けるため、増幅の前と後のステップでは、実験室、ピペットや用具、上着やグローブを分けて使用することをお勧めします。試薬は DNA の混入の原因となりうる物質、特に DNA 増幅産物からは隔離して保存して下さい。
- 増幅後の部屋から、増幅前の部屋に戻ることは避けて下さい。
- 増幅手順に使用する全てのピペットチップやチューブはオートクレーブ滅菌して下さい。フィルター付きのピペットチップの使用をお勧めします。
- 各分注毎に新しい滅菌ピペットチップを使用して下さい。
- 試薬バイアルを開ける前に軽くボルテックスにかけ、試薬をよく混ぜて下さい(特に LiPA-Taq)。使用後は直ちに全てのバイアルを閉じて下さい。
- 試薬への微生物のコンタミを避けて下さい。
- LiPA-Taq (LT)は $-15^{\circ}\text{C}\sim-20^{\circ}\text{C}$ に保存して下さい。
- オリジナルのバイアルのまま $-15^{\circ}\text{C}\sim-20^{\circ}\text{C}$ で保存した場合、試薬はキットの使用期限まで安定ですが、小分けして $-15^{\circ}\text{C}\sim-20^{\circ}\text{C}$ に保存する事をお勧めします。

株式会社ベリタス 〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル

TEL 03-3593-3211 FAX 03-3593-3216

技術的なお問い合わせは：TEL 03-3593-3385 E-mail techservice@veritastk.co.jp

INNO-LiPA 使用方法 (ハイブリダイゼーション編)

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認ください。

内容:

コード No.	品名	梱包単位	保存温度	輸送温度
IG-80332	INNO-LiPA HLA-A Update	20 Tests	冷蔵/冷凍 (-20℃)	冷蔵/冷凍 (-20℃)
IG-80634	INNO-LiPA HLA-B Update Plus	20 Tests	冷蔵/冷凍 (-20℃)	冷蔵/冷凍 (-20℃)
IG-80342	INNO-LiPA HLA-C	20 Tests	冷蔵/冷凍 (-20℃)	冷蔵/冷凍 (-20℃)
IG-80344	INNO-LiPA HLA-DPB	20 Tests	冷蔵 (4℃)	冷蔵 (4℃)
IG-80703	INNO-LiPA HLA-DQA1	20 Tests	冷蔵/冷凍 (-20℃)	冷蔵/冷凍 (-20℃)
IG-80336	INNO-LiPA HLA-DQB1 Update	20 Tests	冷蔵/冷凍 (-20℃)	冷蔵/冷凍 (-20℃)
IG-80340	INNO-LiPA HLA-DRB decoder	20 Tests	冷蔵/冷凍 (-20℃)	冷蔵/冷凍 (-20℃)
IG-80635	INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus	20 Tests	冷蔵/冷凍 (-20℃)	冷蔵/冷凍 (-20℃)

梱包内容:

● INNO-LiPA HLA-A Update

A*01 から A*80 までの、アレルグループレベルの判定を行うキットです。

※使用後は、全てのバイアルを直ちに閉めて下さい。

試薬名	容量	数量	内容
LiPA HLA-A ストリップ 1	20 枚入	1 本	藍色のマーカーラインがストリップ上に印刷
LiPA HLA-A ストリップ 2	20 枚入	1 本	濃緑色のマーカーラインがストリップ上に印刷
LiPA HLA-A Control (LC)	50 µL	1 本	EDTA と防腐剤の 0.01% (MIT), 0.1% (CAA) を含んだ Tris buffer 中のコントロールで緑色のキャップ
DS	1 mL	1 本	Denaturation Solution
HS	80 mL	2 本	Hybridization Solution
SW	200 mL	2 本	Stringent Wash Solution
C	1.5 mL	1 本	濃縮 Conjugate 使用前に Conjugate Diluent (CD) で 100 倍に希釈
CD	150 mL	1 本	Conjugate Diluent
S	1.5 mL	1 本	BCIP/NBT Substrate Solution 使用前に Substrate Buffer (SB) で 100 倍に希釈
SB	235 mL	1 本	Substrate Buffer
RS	80 mL	2 本	濃縮 Rinse Solution、使用前に蒸留水で 5 倍希釈
インキュベートトレー		5 枚	8 本の溝付トレー
プラスチックリーディング チャート		1 枚	陽性プローブ確認用
LiPA HLA-A タイピングテーブル		1 枚	結果のマニュアル解釈用
データレポートニングシート		2 枚	発色したストリップの保存用

● **INNO-LiPA HLA-B Update**

B*07から B*83までの、アレルグループレベルの判定を行うキットです。

Bw4 と Bw6 を区別する 4 種類のプローブもキットに含まれています。

※使用後は、全てのバイアルを直ちに閉めて下さい。

試薬名	容量	数量	内容
LiPA HLA-B ストリップ 1	20 枚入	1 本	茶色のマーカーラインがストリップ上に印刷
LiPA HLA-B ストリップ 2	20 枚入	1 本	黄色のマーカーラインがストリップ上に印刷
LiPA HLA-B Control (LC)	50 µL	1 本	EDTA、防腐剤の 0.01% MIT、0.1% CAA を含む Tris buffer 中のコントロール、緑色のキャップ
DS	1 mL	1 本	Denaturation Solution
HS	80 mL	2 本	Hybridization Solution
SW	200 mL	2 本	Stringent Wash Solution
C	1.5 mL	1 本	濃縮 Conjugate 使用前に Conjugate Diluent (CD) で 100 倍に希釈
CD	150 mL	1 本	Conjugate Diluent
S	1.5 mL	1 本	BCIP/NBT Substrate Solution 使用前に Substrate Buffer (SB) で 100 倍に希釈
SB	235 mL	1 本	Substrate Buffer
RS	80 mL	2 本	濃縮 Rinse Solution、使用前に蒸留水で 5 倍希釈
インキュベートトレー		5 枚	8 本の溝付トレー
プラスチックリーディング チャート		1 枚	陽性プローブ確認用
LiPA HLA-B タイピングテーブル		1 枚	結果のマニュアル解釈用
データレポーターシート		2 枚	発色したストリップの保存用

● **INNO-LiPA HLA-C**

Cw*01 から Cw*18 までアレルグループレベルの判定を行うキットです。

※使用後は、全てのバイアルを直ちに閉めて下さい。

試薬名	容量	数量	内容
LiPA HLA-C ストリップ	20 枚入	1 本	オレンジ色のマーカーラインがストリップ上に印刷
LiPA HLA-C Control (LC)		1 本	EDTA、防腐剤の 0.01% MIT、0.1% CAA を含む Tris buffer 中のコントロールで、橙色キャップ
DS	1 mL	1 本	Denaturation Solution
HS	80 mL	1 本	Hybridization Solution
SW	200 mL	1 本	Stringent Wash Solution
C	0.8 mL	1 本	濃縮 Conjugate 使用前に Conjugate Diluent (CD) で 100 倍に希釈
CD	80 mL	1 本	Conjugate Diluent
S	0.8 mL	1 本	濃縮 BCIP/NBT Substrate Solution 使用前に Substrate Buffer (SB) で 100 倍に希釈
SB	180 mL	1 本	Substrate Buffer
RS	60 mL	1 本	濃縮 Rinse Solution 使用前に蒸留水で 5 倍に希釈
インキュベートトレー		3 枚	8 本の溝付トレー
プラスチックリーディング チャート		1 枚	陽性プローブ確認用
LiPA HLA-C タイピングテーブル		1 枚	結果のマニュアル解釈用
データレポーターシート		2 枚	発色したストリップの保存用

● **INNO-LiPA HLA-DRB1**

*DRB1*01* から *DRB1*16* までアレルブロードタイピングの判定を行うキットです。

※使用後は、全てのバイアルを直ちに閉めて下さい。

試薬名	容量	数量	内容
LiPA HLA-DRB1 ストリップ	20 枚入	1 本	黒色のマーカーラインがストリップ上に印刷
LiPA HLA-DRB1 Control (LC)	50 μ L	1 本	EDTA、防腐剤の 0.01% MIT、0.1% CAA を含む Tris buffer 中のコントロールで、青色キャップ
DS	1 mL	1 本	Denaturation Solution
HS	80 mL	1 本	Hybridization Solution
SW	200 mL	1 本	Stringent Wash Solution
C	0.8 mL	1 本	濃縮 Conjugate 使用前に Conjugate Diluent (CD) で 100 倍に希釈
CD	80 mL	1 本	Conjugate Diluent
S	0.8 mL	1 本	濃縮 BCIP/NBT Substrate Solution 使用前に Substrate Buffer (SB) で 100 倍に希釈。
SB	180 mL	1 本	Substrate Buffer
RS	60 mL	1 本	濃縮 Rinse Solution 使用前に蒸留水で 5 倍 (1 容積 : 4 容積) に希釈。
インキュベートトレイ		3 枚	8 本の溝付トレイ
プラスチックリーディングチャート		1 枚	陽性プローブ確認用
LiPA HLA-DRB1 タイピングテーブル		1 枚	結果のマニュアル解釈用
データレポーティングシート		2 枚	発色したストリップの保存用

● **INNO-LiPA HLA-DRB decoder**

DRB (DRB1, DRB3, DRB4 および *DRB5)* アレルタイピングを行うキットです。

※使用後は、全てのバイアルを直ちに閉めて下さい。

試薬名	容量	数量	内容
LiPA HLA-DRB decoder ストリップ 1	20 枚入	1 本	黒色のマーカーラインがストリップ上に印刷
LiPA HLA-DRB decoder ストリップ 2	20 枚入	1 本	赤色のマーカーラインがストリップ上に印刷
HLA-DRB Control (LC)	50 μ L	1 本	EDTA、防腐剤の 0.01% MIT、0.1% CAA を含む Tris buffer 中のコントロールで、青色キャップ
DS	1 mL	1 本	Denaturation Solution
HS	80 mL	2 本	Hybridization Solution
SW	200 mL	2 本	Stringent Wash Solution
C	1.5 mL	1 本	濃縮 Conjugate 使用前に Conjugate Diluent (CD) で 100 倍に希釈
CD	150 mL	1 本	Conjugate Diluent
S	1.5 mL	1 本	BCIP/NBT Substrate Solution 使用前に Substrate Buffer (SB) で 100 倍に希釈
SB	235 mL	1 本	Substrate Buffer
RS	80 mL	2 本	濃縮 Rinse Solution、使用前に蒸留水で 5 倍希釈
インキュベートトレイ	5 枚	5 枚	8 本の溝付トレイ
プラスチックリーディングチャート	1 枚	1 枚	陽性プローブ確認用
HLA-DRB decoder タイピングテーブル	1 枚	1 枚	結果のマニュアル解釈用
データレポーティングシート		2 枚	発色したストリップの保存用

● **INNO-LiPA HLA-DQB1**

DQB1*01からDQB1*16までアリルをブロードタイピングするキットです。

※ 使用後は、全てのバイアルを直ちに閉めて下さい。

試薬名	容量	数量	内容
LiPA HLA-DQB1 ストリップ	20 枚入	1 本	葡萄色のマーカーラインがストリップ上に印刷
LiPA HLA-DQB1 Control (LC)	50 μ L	1 本	EDTA と防腐剤の 0.01% MIT / 0.1% CAA を含む Tris buffer 中のコントロールで、茶色キャップ
DS	1 mL	1 本	Denaturation Solution
HS	80 mL	1 本	Hybridization Solution
SW	200 mL	1 本	Stringent Wash Solution
C	0.8 mL	1 本	濃縮 Conjugate 使用前に Conjugate Diluent (CD) で 100 倍に希釈。
CD	80 mL	1 本	Conjugate Diluent
S	0.8 mL	1 本	濃縮 BCIP/NBT Substrate Solution 使用前に Substrate Buffer (SB) で 100 倍に希釈。
SB	180 mL	1 本	Substrate Buffer
RS	80 mL	1 本	濃縮 Rinse Solution、使用前に蒸留水で 5 倍希釈
インキュベートトレイ		3 枚	8 本の溝付トレイ
プラスチックリーディングチャート		1 枚	陽性プローブ確認用
LiPA HLA-DQB1 タイピングテーブル		1 枚	結果のマニュアル解釈用
データレポーティングシート		2 枚	発色したストリップの保存用

● **INNO-LiPA HLA-DPB**

DPB アリルのブロードタイピングの判定を行うキットです。

※ 使用後は、全てのバイアルを直ちに閉めて下さい。

試薬名	容量	数量	内容
LiPA HLA-DPB1 ストリップ	20 枚入	1 本	濃紫色のマーカーラインがストリップ上に印刷
DS	1 mL	1 本	Denaturation Solution
HS	80 mL	1 本	Hybridization Solution
SW	200 mL	1 本	Stringent Wash Solution
C	0.8 mL	1 本	濃縮 Conjugate 使用前に Conjugate Diluent (CD) で 100 倍に希釈。
CD	80 mL	1 本	80mL の Conjugate Diluent
S	0.8 mL	1 本	BCIP/NBT Substrate Solution 使用前に Substrate Buffer (SB) で 100 倍に希釈。
SB	180 mL	1 本	Substrate Buffer
RS	80 mL	1 本	濃縮 Rinse Solution、使用前に蒸留水で 5 倍希釈
インキュベートトレイ		3 枚	8 本の溝付トレイ
プラスチックリーディングチャート		1 枚	陽性プローブ確認用
LiPA HLA-DPB タイピングテーブル		1 枚	結果のマニュアル解釈用
データレポーティングシート		2 枚	発色したストリップの保存用

1. 準備:

- 増幅産物は**10 μ L**使用します。サンプルの準備に関しては、別冊の増幅編をご参照ください。
- LiPA HLA Control sampleは**10 μ L** 使用します。増幅の必要はありません。
- ブランクの増幅コントロールサンプル (Negative Control) も**10 μ L**使用します。
- 全てのテスト材料は使用前に室温 (20–25°C) に戻します。
- Hybridization Solution (HS) と Stringent Wash Solution (SW) は、37°C以上で予め温めておきます。但し56°Cは越えないように注意して下さい (全ての結晶は使用前に溶かしておきます)。
- **Rinse Solution**
濃縮Rinse Solution (RS) を、蒸留水またはイオン交換水で5倍希釈して使用します。
チャンバー1個あたり8 mLのRinse Solutionと、さらに余分に10 mLを用意します。
- **Conjugate Solution**
濃縮Conjugate (C) をConjugate Diluent (CD) で100倍希釈して使用します。
チャンバー1個あたり2 mLのConjugate Solutionと、さらに余分に2 mLを用意します。
(Conjugate Solutionはstringent washの間に調製可能です)
- **Substrate Solution**
濃縮BCIP/NBT Substrate (S) をSubstrate Buffer (SB) で100倍希釈して使用します。
チャンバー1個あたり2 mLの希釈したSubstrateと、さらに余分に2 mLを用意します。
(Substrate Solutionは conjugate incubation間に調製可能です)

2. 操作方法:

2.1 変性とハイブリダイゼーション

1. 振盪可能なウォーターバスを $56 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に温めておきます。目盛り付き温度計でウォーターバスの温度を確認します。Hybridization Solution (HS) と Stringent Wash Solution (SW) はウォーターバス中で 37°C 以上 56°C を越えない温度に予め温めておきます。使用前に混合します。全ての結晶は使用前に溶かしておきます。
2. ピンセットを用いてチューブからストリップを必要な数だけ取り出します (各テストにより異なるので注意)。LiPA HLA Control サンプル (LC) とブランクコントロールを含めて実施してください。2種類のストリップのLCは両方とも**ハイブリダイゼーション温度が適切か**を確認する目的で行いますので、どちらか一方のLCを用いれば構いません。
3. 検体番号をストリップのラインマーカー上側に鉛筆で書き込みます (ボールペン不可)。常にDNAを添加しないランクコントロール用として1本のストリップを用意します。
4. 必要な数のテストチャンバーを取り出し (テストサンプル毎に1個)、トレイに置きます。
5. 各チャンバーの上側角に $10 \mu\text{L}$ の Denaturation Solution (DS) をピペットで入れます。
注: 使用後は直ちにバイアルを閉めます。
6. $10 \mu\text{L}$ のサンプルを加え、上下にピペッティングし注意深く混合します。常に滅菌ピペットチップを使用します。変性させるため、 $20\text{-}25^\circ\text{C}$ で5分間放置します。
7. 予め温めておいた Hybridization Solution (HS) を振り混ぜ、 2 mL ずつゆっくりと各チャンバーに変性した増幅産物に添加します。ゆっくりとトレイを前後に揺り動かし混合します。ピペッティングの間に、隣接するチャンバーと混ざらないように注意してください。
8. 直ちに印をした面が上になるようにストリップをチャンバーに置きます。ストリップは溶液に完全に浸るようにします。
注: 使い捨て手袋をはめ、ピンセットを使用します。
9. トレイを 56°C の振盪可能なウォーターバスに置きます (約 80rpm) 。

10. ふたをして 30 分間インキュベートします。

注：ウォーターバスから溝に水が飛び散らないようにします。溝の高さの 1/3 から 1/2 になるように水位を調節します。トレーに水が入らないように気をつけてください。

2.2 洗浄

1. ハイブリダイゼーションの後、トレーをウォーターバスから取り出します。
2. トレーを少し傾けて、ピペットでチャンバーから液体を吸い取ります。吸引アスピレーターを用いることをお勧めします。予め温めておいた Stringent Wash Solution (SW) 2 mL を各チャンバーに加え、20-25°C でトレーを簡単に揺り動かし (10-20 秒間) 洗浄します。各チャンバーから溶液を吸い取ります。もう一度この洗浄を繰り返します。
3. 最後に溶液を吸い取り、予め温めておいた Stringent Wash Solution (SW) 2 mL を各チャンバーに加え、56±0.5°C の振盪可能なウォーターバスで 10 分間インキュベートします。ウォーターバスのふたは閉めておきます。インキュベーション前に温度計でウォーターバスの温度を確認し、必要に応じて温度を調節します。常にふたは閉めておきます。
注：Stringent Wash の間に濃縮 Rinse Solution (RS) や Conjugate (C) を希釈しておきます。

2.3 発色

一連のインキュベーションは全て、シェーカー上 (20-25°C) で行います。インキュベーションの間、均一な染色を行なうために液体とテストストリップが、チャンバーの中で前後に動くようにします。

1. 各ストリップを 2 mL の希釈した Rinse solution で 1 分間、2 回洗浄します。
2. 各チャンバーに 2 mL の希釈した Conjugate を加え、シェーカー上でトレーを揺り動かしながら、30 分間インキュベーションします。
注：Conjugate インキュベーションの最後の 10 分間で、BCIP/NBT Substrate Solution (S) を希釈しておきます。
3. 各ストリップを 2 mL の希釈した Rinse solution で 1 分間、2 回洗浄し、2 mL の Substrate Buffer (SB) でもう一度洗浄します。
4. 各チャンバーに 2 mL の希釈した Substrate solution を加え、シェーカー上でトレーを揺り動かしながら、30 分間インキュベーションします。
注：BCIP/NBT Substrate Solution (S) は Dimethylformamide を含んでおり、胎児には有害です。さらに、この溶液は吸入や皮膚の接触、飲み込んだりすると有害で目も刺激されます。手袋をつけ、保護用の眼鏡をして下さい。
5. 少なくとも 3 分間は シェーカーの上でトレーを揺り動かしながら、2 mL の蒸留水で 2 回ストリップを洗浄することにより発色を停止させます。
6. ピンセットで、チャンバーからストリップを取り出し、濾紙上に置きます。結果を読みとる前に、ストリップを完全に乾燥させます。発色し乾燥したストリップは暗所で保管します。

2.4 結果読み取り

陽性の場合、ストリップ上に紫色のバンドが現われます。

ストリップ上にはマーカライン、Cojugate コントロールライン (Conj. control)、コントロールラインが現れます。添付のプラスチックリーディングチャートをストリップ上に重ね、陽性バンドを確認します。付属のコンピューターかタイピングテーブルを利用して HLA 判定を行います。

注意事項

- 本製品は研究用試薬です。疾患の治療や診断の目的で使用することはできませんのでご注意ください。
- 未開封の試薬や、2~8℃で保存した全ての試薬（テストストリップを含む）は、使用期限まで安定しています。試薬は凍結させないでください。
- キットはDNAの混入の原因となるようなもの、特にDNA増幅産物からは隔離して保存します。
- 全ての試薬やテストストリップの入ったプラスチックチューブは、使用の約30分前に室温（20-25℃）に取り出し、使用後は直ちに冷蔵庫に戻します。
- Denaturation Solution（DS）の入ったバイアルは使用後直ちにフタを閉めます。この溶液を空気中に長時間さらすと変性能力が急速に劣化します。
- キット中の試薬類の外観による変化は、不安定性や劣化を示しています。
- 発色後の乾燥したストリップは遮光して、室温（20-25℃）で保存します。
- 危険性の考えられる含有物については、製品ラベルおよび製造物安全データを参照してください。
- LiPA Control（LC）、Conjugate（C）、Conjugate Diluent（CD）、Rinse Solution（RS）には防腐剤として、MIT/CAAを含んでいます。
- BCIP/NBT Substrate Solution（S）はDimethylformamideを含んでいて、胎児には有害です。さらに、この溶液は吸入や皮膚の接触、飲み込んだりすると有害で、目も刺激されます。手袋をつけ、保護用の眼鏡をして取り扱って下さい。
- Denaturation Solution（DS）は水酸化ナトリウムを含み、目や皮膚を刺激します。手袋をつけ、保護用の眼鏡をして下さい。
- ストリップの取り扱いに関して
 - ストリップを素手で触れず、清潔なピンセットを用いて取り扱ってください。
 - ストリップの番号記入には鉛筆を用い、ボールペン等は使用しないでください。番号はストリップのマーカークラインの上側に記入します。
 - ストリップはチャンバーの中では、プローブがコートされた面（印がある面）を上側に置きます。
 - インキュベーションの間、ストリップは常に同一のチャンバー内で実験を行ってください。
 - 未使用のストリップおよび発色後のストリップは、強い光や熱から避けて保存してください。
 - 発色後のストリップは、判定やカバーをして保存する前に完全に乾燥させてください。
 - 発色後の乾燥ストリップは、20-25℃の暗所で保存することをお勧めします。

株式会社ベリタス 〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL 03-3593-3211 FAX 03-3593-3216
技術的なお問い合わせは：TEL 03-3593-3385 E-mail techservice@veritastk.co.jp

INNO-LiPA ハイブリダイゼーション手順概要

このキットの添付文書には詳しいプロトコールが含まれています。始める前に注意深く読んで下さい。

1. 変性・ハイブリダイゼーション → 56℃の振盪可能なウォーターバス、蓋を閉める

Denaturation Solution (DS)	10 µL	各チャンバーに添加
増幅産物	10 µL	DSに添加、 20-25℃、5分間インキュベーション
Hybridization Solution (HS)	2 mL	優しく混合
LiPA HLA ストリップ	1枚	56℃、30分間インキュベーション

2. 洗浄 → 56℃の振盪可能なウォーターバス、蓋を閉める

Stringent Wash (SW)	2 mL×2回	それぞれ10-20秒、ストリップを洗浄
※ 調整済み、予め温めておく	2 mL	56℃、10分間インキュベーション

3. 発色 → シェーカー、20-25℃

Rinse Solution ※ RSを水で5倍希釈	2 mL×2回	各1分間、ストリップをリンス
Conjugate solution ※ CをCDで100倍希釈	2 mL	20-25℃、30分間インキュベーション
Rinse Solution ※ RSを水で5倍希釈	2 mL×2回	各1分間、ストリップをリンス
Substrate buffer (SB)	2 mL	1分間、ストリップをリンス
Substrate solution ※ SをSBで100倍希釈	2 mL	20-25℃、30分間インキュベーション
蒸留水	2 mL×2回	各3分間、2回ストリップをリンス

4. 判定後、ストリップを保存