

詳細は英文 (LABScreen Autoantibody の Application note) を参照ください。

Catalog ID	Product Name
LSAUT1	LABScreen Autoantibody Group1
LSAUT2	LABScreen Autoantibody Group2

AutoAntibody 製品は NC 及び PC は必要ありません。

## 試薬

### ➤ 特徴

1. LABScreen Autoantibody グループ 1 は、マイクロ粒子に non-HLA 抗体に対する抗体を検出するために精製された non-HLA 抗原がコートされたものです。
2. LABScreen Autoantibody グループ 2 は、マイクロ粒子に LG3 に対する抗体を検出するために精製された LG3 non-HLA 抗原がコートされたものです。

### ➤ 保存条件

1. LABScreen Autoantibody 製品は、ドライアイスで出荷されます。  
最初の使用時までまたは有効期限まで、 $-65^{\circ}\text{C}$ 以下の冷凍庫に保存してください。
2. ビーズを解凍した場合は、再凍結しないでください。2~ $8^{\circ}\text{C}$ で保存し 最大 3 ヶ月または有効期限まで使用可能です。(どちらか早いほう)
3. 洗浄バッファーを解凍した場合は、2~ $8^{\circ}\text{C}$ で保存し、最大 3 ヶ月または有効期限まで使用可能です。(どちらか早いほう)

## 必要な機器

### ➤ 必要な機器及び器具

1. LABScan システムまたは LABScan 3D システム
2. 96well プレート用遠心分離器 (1800 g)
3. ボルテックス
4. プレートシェーカー
5. HLA Fusion Research Version 6.0 以上

## 検体採取と準備

### ➤ 使用できる検体

1. 未開封の血液検体は、室温で4日まで保存できます。分離した血清（凝固したサンプル）（ACDまたはK-EDTA中）は7日まで冷蔵で使用できます。-20℃～-80℃で凍結させた血清は3年間まで使用可能で、アッセイの直前に解凍してください。しかし、解凍した血清は試験前に遠心分離（8,000～14,000gで10分間）または濾過（0.2μm）行います。サンプルの凝集物または汚染によって無効な結果が生じる可能性があります。最良の結果を得るために、10,000g以上の高速遠心分離を推奨します。
2. 血清を熱不活性化しないでください。
3. 希釈された血清をしないでください。

## 方法

### ➤ 製品内容

Catalog ID	製品名	梱包
LSAUT1	LABScreen Autoantibody Group1	LABScreen Autoantibody Bead Mix-Group1 LABScreen Wash Buffer 13ml 10x
LSAUT2	LABScreen Autoantibody Group2	LABScreen Autoantibody Bead Mix-Group2 LABScreen Wash Buffer 13ml 10x

### ➤ 添付されていないが必要な試薬

1. PE-Conjugated Goat Anti-Human IgG
2. PBS,
3. 96well マイクロプレート 250ul (Whatman no. 7701-2250)
4. Tray seal (OLI Cat#SSPSEA300)

### ➤ 使用方法

#### 96well プレート法

#### ■ 注意

Well のコンタミを防ぐためにトレーを注意深く完全にシールします。96 ウェルの各ウェルの端を押し付けるようにしてトレーシールを貼ってください。トレーシールを再使用しないでください。ステップごとに新しいシールを使用してください。

■ 陰性血清は不要です。

➤ 検査手順

1. LABScreen Autoantibody ビーズは、使用前に数回ピペッティングでよく混合します
2. 96 ウェル “V”底部に 20  $\mu$  l の血清と LABScreen Autoantibody ビーズ 5  $\mu$  l を混和し 30 分、暗所 20~25°C でシェーキングしながらインキュベートします。
3. 10 倍洗浄バッファー（カタログ番号#LSPWABUF）を蒸留水で希釈して、1X 洗浄バッファーを調製します。
4. インキュベーション後、150  $\mu$  l の 1X 洗浄バッファーをプレートの各ウェルに加えます。トレーをシールし、ボルテックス後 **1800g** で 5 分間遠心分離します。
5. フリックによってプレートのウェルから洗浄バッファーを除去します。
6. 200  $\mu$  l の 1X 洗浄バッファーをプレートの各ウェルに加えます。新しいトレーシールをし、ボルテックス後 **1800g** で 5 分間遠心分離します。
7. フリックでプレートのウェルから洗浄バッファーを除去します。
8. 手順 6 と 7 を繰り返します。（洗浄回数合計 3 回）
9. 99  $\mu$  l の 1X 洗浄バッファーと PE conjugated anti-Human IgG、1  $\mu$  l を混和して 1 検体分の試薬を作製します。
10. 100  $\mu$  l の PE conjugated anti-Human IgG を各ウェルに添加します。トレーシールでカバーしてボルテックスしてください。30 分、暗所 20~25°C でシェーキングしながらインキュベートします。
11. **1800g** で 5 分間遠心分離します。
12. フリックでプレートのウェルから液を除去します。
13. 手順 6 と 7 を 2 回繰り返します。各ウェルに 80  $\mu$  l の 1X PBS を添加し、測定します。すぐに測定しない場合は暗所で 2~8°C で 24 時間保存することができます。

◇ グループ 1 とグループ 2 をコンバインして検査測定

1. 二つの試薬を混和し、検査測定できる場合があります。LABScreen Autoantibody Bead Combination Table を参照して測定します。
2. 他の LABScreen 試薬とはコンバインしないでください。

コンバインする場合

1. 各ビーズを等量混和します。1 テストに 10  $\mu$  l のビーズを入れます。
2. 以下のように混和してください。

Catalog ID	Beads 量 (1 テスト)	血清
LSAUT1+LSAUT2	5 $\mu$ l + 5 $\mu$ l	40 $\mu$ l

## 結果

### ➤ データ分析

1. 検査サンプルの反応性は、Output.csv の raw trimmed mean fluorescence values から計算されます。
2. 陰性コントロールビーズへの非特異的結合を補正することによって血清反応性を計算します。

### ➤ 計算

ベースラインシグナルは、抗原ビーズ (S#N) の値から NC ビーズの値を差し引いた値に等しいです。(SNC ビーズ)。

**LABScreen Autoantibody Baseline :**

$$\text{Baseline} = (\text{S\#N} - \text{SNC ビーズ})$$

### ➤ 陽性反応及び陰性反応の定義

1. それぞれの Reference Background Values 値は、LABScreen Autoantibody のワークシートに記載されています。ある集団で計算された Baseline 反応と比較しています。
  - a. Reference Background Values は、移植歴のないヒトから得られた血清サンプルのスクリーニングデータから決定しました。Reference Background Values 値は trimmed mean 蛍光値の output data の中央値 + 2 倍標準偏差で計算された値です。分布分析は比較のために 3 つの MFI 範囲 (集団の 75%、85%、および 95%) を提供しています。

range は、指定された母集団のパーセンテージの Baseline 以下であることを示しています。
  - b. Reference Background Values の範囲は、測定したベースライン反応と比較し選択することができます。Reference Background Values 値より高いベースライン値を示したものは陽性反応としてさらに検討を要すかもしれません。
  - c. 移植されていない全集団における各抗原の trimmed mean 値は the LABScreen Autoantibody Reference Table を参照してください。
2. もし必要であれば、ユーザは Reference Background Values を使用し計算することも出来ます。
3. HLA Fusion™Research バージョン 6.0 以降 (OLI Cat. #FUSREPRGX) による解析を推奨します。

HLA Fusion™Research は、「計算」セクションで概説した「ベースライン」を計算します。注：陰性対照血清 (OLI カタログ番号 LSAUT-NC) は、ベースライン計算に使用しません。

## 制限

- ・汚染物質または凝集物を含む血清サンプルは、LABScan で詰まりを起こすことがあります。血清中の凝集物は、試験前に遠心分離によって除去してください。
- ・LABScan 100/200 と LABScan3D が配置されている周囲温度は、機械の校正に影響することがあります。
- ・周囲温度が変化した場合は、機械の再校正が必要になることがあります。
- ・正確なデータ収集は、LABScan 100/200 および LABScan3D の適切なパフォーマンスに依存します。
- ・抗体特異性は、各パネルビーズに示された LABScreen Autoantibody 抗原に限定されています（ロットのワークシートを参照）。
- ・各抗原に使用されるビーズ領域およびパネルの抗原組成は、ロット間で変化することがありますので、ロットのワークシートを参照してください。
- ・自己抗体は、健康で輸血歴のヒトにもある一定の頻度で自然発生します。