

## LABScreen Autoantibody 説明書

株式会社ベリタス

本製品は研究用試薬です。

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

Catalog ID	Product Name
LSAUT1	LABScreen Autoantibody Group1
LSAUT2	LABScreen Autoantibody Group2
LSAUT3	LABScreen Autoantibody Group3

Autoantibody 製品は NC 血清及び PC 血清を使用する必要はありません。

PC 血清は Group1, 2 のみに対応です。

### 試薬について

#### ➤ 特徴

LABScreen Autoantibody 製品は、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 抗原がコーティングされたものです。

#### ➤ 保存条件

1. LABScreen Autoantibody 製品はドライアイスで出荷されます。  
初回使用時まで、または有効期限までは $-65^{\circ}\text{C}$ 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。解凍後は $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保存し、3ヶ月または有効期限のどちらか早い時期まで使用可能です。
3. 洗浄バッファーを解凍した場合は、 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保存し、解凍後3ヶ月または有効期限のどちらか早い時期まで使用可能です。

### 必要な機器

- LABScan システムまたは LABScan 3D システム
- 96well プレート用遠心分離器 (1800 g)
- ボルテックス機器
- プレートシェカー
- HLA Fusion™ Research Version6.0 以上 (判定用ソフト)

### 検体採取と準備

- 未開封の血液検体は室温で4日まで保存できます。分離した血清は7日まで冷蔵保存で使用できます。 $-20^{\circ}\text{C}\sim -80^{\circ}\text{C}$ で凍結させた血清は3年間使用可能ですが、測定

2022/01/05 改訂

TDX-OLI-DMR-PS-2315 Rev05

の直前に解凍してください。

- 解凍した血清は測定前に遠心(8,000-14,000g、10分間)またはろ過(0.2 μm)を行います。よい結果を得るためには、きれいなサンプルを使用することが重要です。特によい結果を得るために10,000g以上の高速遠心分離を推奨します。特にGroup3においては、よい結果を得るために15,000g、30分の高速遠心分離を推奨します。
- 血清を熱で不活性化しないでください。
- One Lambdaのバックグラウンド値を使用する場合は、検体血清をDTT、及びEDTA処理をしないでください。
- EDTAやDTT処理はバックグラウンドに影響を及ぼします。EDTAやDTT処理を行う場合は自施設で陽性・陰性のバックグラウンド値を検討してください。
- 希釈された血清をしないでください。Group3は高速遠心(8,000-14,000g、10分間)を行った直後に使用してください。(推奨は、15,000g、30分遠心。特に測定中にカウント数が少なくなる場合は、検体からアグリゲーションを除くことが大切です)
- 血漿サンプルの使用は推奨しません。MFIの値が血清サンプルを使用した際と比較して半分程度になることがあります。

## 検査手順

- 製品内容

Catalog ID	製品名	キット内容
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
LSAUT3	LABScreen Autoantibody Group3	LABScreen Autoantibody Bead Mix-Group3 LABScreen Wash Buffer 13ml 10x

- キットに含まれていない必要な試薬
  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. トレーシール(OLI Cat #SSPSEA300)

2022/01/05 改訂

TDX-OLI-DMR-PS-2315 Rev05

➤ 注意

1. Well 間のコンタミを防ぐためにトレーシールをしっかりと貼ってください。96 ウェルの各ウェルの端を押し付けるようにして貼ってください。シールを再利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。
2. Group3 を測定する場合は、測定の直前に 8,000-14,000g、10 分間で遠心を行ってください。
3. **陰性血清は不要です。**（解析時に陰性血清のデータは使用しません）
4. メーカーの Background Values 値を使用する場合は、検体の前処理として EDTA または DTT の使用は推奨しません。

➤ コンバイン測定

1. Group1 と Group2 はコンバインして測定できますが、**Group3 は wash buffer が異なるためコンバインできません。**
2. 他の LABScreen 試薬とはコンバインしないでください。
3. コンバインする場合は、以下の容量で混和してください。

Catalog ID	Beads 量 (1テスト)	血清
LSAUT1+LSAUT2	5µL (Group1)+ 5µL (Group2)	40µL

➤ 検査手順

1. LABScreen Autoantibody ビーズは、使用前にボルテックスまたは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 20µL の血清と LABScreen Autoantibody ビーズ 5µL を混和し 30 分、暗所 20~25°C で振とうしながらインキュベートします。
3. 10×洗浄バッファーを蒸留水で希釈して、1×洗浄バッファーを調製します。**Group3 は洗浄バッファーが異なりますので注意してください。**

Group1、Group2：カタログ番号 LSPWABUF

Group3：カタログ番号 LSPAUT3-WB

4. インキュベーション後、150µL の 1×洗浄バッファーをプレートの各ウェルに加えます。トレーシールを貼り、ボルテックス後 **1800g** で 5 分間遠心分離します。
5. フリッキングによりプレートのウェルから洗浄バッファーを除去します。
6. 200µL の 1×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貼り、ボルテックス後 **1800g** で 5 分間遠心分離します。
7. フリッキングにより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。（洗浄回数は合計 3 回です）
9. 1 検体あたり、99µL の 1×洗浄バッファーと PE conjugated anti-Human IgG、1µL を混和して、検体数分の PE conjugated anti-Human IgG 分の試薬を作製します。

2022/01/05 改訂

TDX-OLI-DMR-PS-2315 Rev05

(1 検体分多めに作成することをお勧めします)

10. 手順9で作成した PE conjugated anti-Human IgG を 100 $\mu$ L ずつ各ウェルに添加します。トレーシールを貼りボルテックス後、30 分間、暗所 20~25 $^{\circ}$ C で振とう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. フリッキングによりプレートのウェルから液体を除去します。
13. 手順6と7を2回繰り返します。
14. 各ウェルに 80 $\mu$ L の 1 $\times$ PBS を添加し測定します。すぐに測定しない場合は暗所、2~8 $^{\circ}$ C で 24 時間保存することができます。

## 測定結果

### ➤ データ解析

1. ベースライン値を使用して判定します。
2. ベースライン値は Output.csv ファイル内の raw trimmed mean fluorescence values から算出されます。
3. ベースラインの値は、抗原ビーズ (S#N) の値から NC ビーズの値 (SNC ビーズ) を引いた値です。(陰性コントロールビーズへの非特異的結合を補正しています)

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

### ➤ 結果判定

1. Reference Background Values 値(以下 RBV 値)を使用して結果判定を行います。75%、85%、95%のどちらの値を使用して頂いても構いません。
2. 各ビーズの RBV 値は、LABScreen Autoantibody のワークシートに記載されています。
  - ✓ RBV 値は、移植歴のないヒトから得られた前処理を行っていない血清サンプルを測定した結果を用い、trimmed mean の中央値+2SD として算出された値です。判定基準として3つの MFI の値 (RBV 値の 75%、85%、95%の値) を提供しています。
  - ✓ 各ビーズの RBV 値の算出に使用した trimmed mean 値は LABScreen Autoantibody Reference Table を参照してください。
3. ご自身で Reference Background Values 値を設定し結果判定をすることも出来ます。
4. HLA Fusion<sup>TM</sup> Research 6.1 を使用して解析してください。  
データをインポートする際に「OLINS」を選択しますが、データ解析には NC 血清の値は使用しませんので、「OLINS」の値は全て「0」となっております。

## 注意事項

- たんぱく質等を含む血清サンプルは、LABScan システム/LABScan3D システムの機器内のつまりの原因となりますので、測定前に遠心分離によって除去してください。特に Group3 の測定時は、測定の前直前に遠心分離を行ってください。
- LABScan システム/LABScan3D システムが設置されている環境の温度は、測定機器の校正に影響することがあります。測定前に、必ず Calibration/Verification が問題なくパスしていることを確認してください。
- 本試薬で測定できる抗原はワークシートを参照してください。また、ロット変更の際に抗原の組成が変更になることがあります。
- Non-HLA 抗体は健康で輸血歴のないヒトにおいてもある一定の頻度で発生しますので、LABScreen Negative Control (LS-NC) を LABScreen Autoantibody で測定した場合に陽性になる可能性があります。
- LABScreen Autoantibody Negative Control (LSAUT-NC) も、LABScreen Autoantibody で測定した場合に、上記と同じ理由により陽性となる場合があります。
- LABScreen Autoantibody Negative Control Serum 及び LABScreen Autoantibody Positive Control Serum (LSAUT-PC) は測定機器や手技の変動の指標として使用することを推奨します。