

LABType® HD Typing Tests

A,B,C,DR 日本語簡易マニュアル

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:

未開封のキットは、 -80°C ～ -20°C で、箱に表示されている有効期限まで保存できます。一度解凍した後の保存方法と有効期限は下記のとおりです。

キット内容	保存方法と有効期限
LABTypeSSO Beads Mixtures (ビーズ溶液)	キットの箱全体を初回使用時まで -80°C ～ -20°C 間でフリーザーに保管して下さい。ラベルに記載された有効期限まで保管することができます。一度解凍したビーズは再凍結しないでください。解凍したビーズは、 <u>最長3ヵ月または有効期限(3ヵ月以内の場合)まで$2-8^{\circ}\text{C}$に保管することができます。遮光保存します。</u>
Denaturation Buffer	-80°C ～ 25°C 間で保存可能です。再凍結は可能です。
Neutralization Buffer	-80°C ～ 25°C 間で保存可能です。再凍結は可能です。
Hybridization Buffer	-80°C ～ 25°C 間で保存可能です。再凍結は可能です。
Wash Buffer	-80°C ～ 25°C 間で保存可能です。再凍結は可能です。
SAPE Buffer	-80°C ～ 8°C 間で保存可能です。解凍後は、 2°C ～ 8°C 間で保管してください。再凍結はしないでください。
Specific Primer	-80°C ～ -20°C 間で保管してください。再凍結は可能ですが、過度の凍結融解する場合は、小分けし、保管することをお勧めします。
Primer Set D-mix	-80°C ～ -20°C 間で保管してください。再凍結は可能ですが、過度の凍結融解する場合は、小分けし、保管することをお勧めします。

必要な試薬:

下記はキットに含まれておりませんので別途ご購入ください。(LT-SAPE は、弊社にてお取り扱いしております)。必要な器具につきましては、別紙「LABTypeSSO 必要なものリスト」をご参照ください。

商品コード	品名	規格
LT-SAPE	L/T PE Conjugated Streptavidin	1 vial (約 2000 tests)
N-808-0160 (Life Technologies)	AmpliTaq DNA Polymerase	250 Units, 5 U/ μL

1. 操作方法:

1.1 DNA 増幅ステップ

1 反応あたりの試薬等の使用量²⁾:

DNA 溶液 ¹⁾	2 μL
D-mix	13.8 μL
増幅プライマーmix	4 μL
Taq Polymerase	0.2 μL

1) DNA サンプルの調製:

抽出した DNA を滅菌蒸留水、または 10 mM Tris-HCl, pH 8.0-9.0 で 20 ng/ μL の濃度に調製する。(A260/A280 1.65 - 1.80)。

EDTA のようなキレート剤が 0.5 mM 以上含まれる事がないようにする。

2) **1 反応あたりの試薬等の使用量 x 反応数**で試薬を調製。ただし Taq Polymerase の分注量が微量で、不正確になりやすいため、**10 反応数分以上で調製する事**を勧める。

1. DNA サンプル、D-mix, 増幅プライマーmix を解凍する。(使用するまで氷上に置く)
2. D-mix, 増幅プライマーmix を 15 秒間 Vortex したのち、軽く遠心する。
3. 新しいチューブに反応数分の D- mix を分注する。さらに反応数分の増幅プライマーmix を加えて 15 秒間 vortex をかけ氷上に置く。 **注意：10 反応数分以上で調製する事。**
4. DNA サンプルを各 2 μ L ずつ PCR 用チューブの底に分注する。
5. 3.で調製した D- mix/増幅プライマーmix に Taq Polymerase **0.2 μ L x 反応数**を加える 15 秒間 vortex をかけて混合。
6. 各反応チューブに 18 μ L ずつ分注。(先に分注してある DNA のクロスコンタミに注意)
7. キャップあるいはシールで蓋する。シールを使用する場合は各 well の縁にしっかり押し付けて確実にシールする事。
8. 約 1 時間半の PCR プログラムで DNA を増幅する。
9. アガロースゲルで増幅確認を行う。

ステップ	温度と時間	サイクル数
ステップ 1	96°C、3 min	1
ステップ 2	96°C、20 sec	5
	60°C、20 sec	
	72°C、20 sec	
ステップ 3	96°C、10 sec	30
	60°C、15 sec	
	72°C、20 sec	
ステップ 4	72°C、10 min	1
ステップ 5	4°C forever	1

1.2 試薬調整ステップ

準備：

1. LABScan™ 100 と XY Platform を『Luminex IS2.2/2.3 操作マニュアル』の『機械のスタート』に従ってスタートアップする。
2. サーマルサイクラーは 60°C HOLD で、1 時間 30 分または、HOLD FOREVER に設定し、サーマルサイクラーを暖めておく。サーマルサイクラーの蓋の温度が適温 (60°C) に達するまで待つてから使用する。適切なインキュベーション温度を保つ為に 96well ホルダーや PCR Pat(OLI Cat.#SSPPAD-for 9600/9700)を使用する事。
3. 遮光容器の 100 \times SAPE 以外の試薬を冷蔵庫から取り出し室温にもどす。きれいな容器に各必要な試薬量を小分けする。ビーズ溶液や SAPE Buffer は必要分取り出したら、直ちに残りは冷蔵庫にもどす。(ビーズ溶液は、再凍結をさける。)
4. 1 \times SAPE は 3 回目の洗浄操作の間に作製する。100 \times SAPE は冷蔵庫で保存し、必要時のみに取り出して試薬調整を行なう。

試薬の調製：

SAPE Stock 溶液：SAPE の使用書に従って 100 \times 溶液を調製。2-5°C で保存。凍結しない事。

ビーズ溶液、Hybridization Buffer、Wash Buffer、Denaturation Buffer、Neutralization Buffer を各 10 秒間 vortex で混合した後、それぞれ別々のきれいなチューブに反応に必要な量を分注する。(その反応数に必要な全量を考えて、チューブのサイズを選ぶ事。)

1 反応あたりの使用量及び試薬の調製法：

		1 反応あたりの使用量	試薬の準備及び注意事項
(1)	ビーズ溶液	4 μ L	反応数 + Extra 分 (約 2 反応分の量) を室温で分注。必ずピペティング又はボルテックスで混合してから分注すること。
(2)	Hybridization Buffer	34 μ L	ビーズ溶液と同反応数分を分注。室温 (20-25 $^{\circ}$ C) に置く。
(3)	Wash Buffer ⁵⁾	480 μ L	反応数+2-4 反応数分を用意すること。 分注後、室温 (20-25 $^{\circ}$ C) に置く。
(4)	Denaturation Buffer	2.5 μ L	反応数分+2-4 反応分を分注して室温 (20-25 $^{\circ}$ C) に置く。
(5)	Neutralization Buffer	5 μ L	反応数分+2-4 反応分を分注して室温 (20-25 $^{\circ}$ C) に置く。
(6)	SAPE Stock ³⁾ (100 \times)	0.5 μ L	使用直前、3 回目 (チューブ方式の場合は 2 回目) の遠心時間の間に反応数分+2-4 反応分の SAPE Stock に同反応数分の SAPE Buffer を加え 10 秒間 Vortex して 1 x SAPE 溶液 を調製。遮光して置く。
(7)	SAPE Buffer	49.5 μ L	

3) SAPE Stock 溶液： SAPE の使用書に従って 100 \times 溶液を調製。2-5 $^{\circ}$ C で保存。凍結しない事。

4) ビーズ 4 μ L に対して Hybridization Buffer 34 μ L 加える。

5) Wash Buffer の使用量はチューブ方式では洗浄ステップを 2 回だけ行なうために 1 反応につき約 380 μ L を必要とする。

1.3 アッセイ方法:96 well トレイ法

注：1.5 mL マイクロチューブを用いる場合は、下記のセクション **1.4** を参照してください。

1.3.1 Denaturation/Neutralization ステップ：

1. クラッシュアイスバスを準備する。
2. トレーホルダーに 96 well トレーを置く。
3. 増幅した DNA を 5 μ L ずつ各 well に加える。 トレー上の各 well の位置と Sample ID を間違えないように記録する。
4. Denaturation Buffer を 2.5 μ L ずつ各 well に加えピペティングし混和する。
5. 室温(20-25 $^{\circ}$ C)で 10 分間インキュベートする。
6. Neutralization Buffer を 5 μ L ずつ加えピペティングし混和する。(色がピンクから無色(やや黄色)に変化するのを確認)。
7. クラッシュアイスバスの上に 6. の PCR トレーをのせる。
注：PCR 産物が、水で汚染させないように注意する。

1.3.2 Hybridization ステップ：

1. サーマルサイクラーのスイッチが入って、60 $^{\circ}$ C のプログラムでサーマルサイクラーのブロックがヒーター

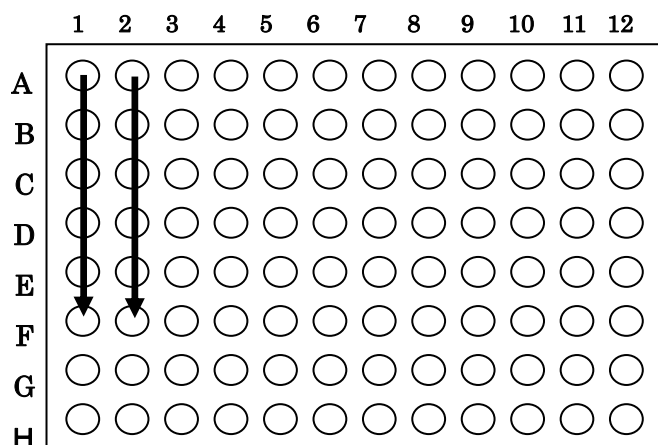
インク開始したかどうか確認する。

2. ビーズ溶液と Hybridization Buffer を混和して Hybridization Bead Mix を準備する。各 well にシングルピペットを利用して 38 μ L ずつ加える。トレーをシールで蓋をして Vortex をかける。低速でしっかりボルテックスをかけて全ウェルを混和する。トレーをラックに入れてしっかり持ち、数箇所場所を変えながら全体的にミキサーに押し付けるとうまく混ざる。
3. トレーをトレーホルダーから、あらかじめ暖めておいたサーマルサイクラーに移し、PCR パットをする。60 $^{\circ}$ C で 15 分間、インキュベートする。
4. 以下の洗いのステップに従う。15 分間のインキュベーションの後、トレーをトレーホルダーに移し、注意深く、シールを剥がし、各 Well に Wash Buffer を 100 μ L ずつ加える。トレーをシールで蓋する。
5. 1000g で 5 分間遠心する。
6. トレーホルダーに移し、シールを注意深く剥がし、専用の 8 連アスピレーター又は 120 μ L にセットした 8 連あるいは 12 連のピペットですべての Well から上清を注意深く除去する。(または、強くフリックすることにより上清を除去する。) 上清を除いたペレットをほぐすためにボルテックスをかける(ドライボルテックス)。なるべく溶液が残らないようにフリックする。上記洗いのステップ(4-6)をさらに 2 回繰り返す。3 回目の洗浄のとき、SAPE Buffer と SAPE Stock を混和して 1 \times SAPE 溶液を作る。

1. 3. 3 Labeling ステップ :

1. 1 \times SAPE 溶液を 50 μ L ずつ各 Well にくわえる。トレーのシールで蓋をして、充分 Vortex をかける。トレーをあらかじめ暖めておいたサーマルサイクラーに移し、PCR パットをする。60 $^{\circ}$ C で 5 分間 incubate する。
2. トレーホルダーに移し、注意深く、シールを剥がし、各 Well に Wash Buffer を 100 μ L ずつ加える。トレーをシールで蓋する。1000g で 5 分間遠心をかける。
3. トレーホルダーに移し、シールを注意深く剥がし、専用の 8 連アスピレーター又は 120 μ L にセットした 8 連あるいは 12 連のピペットですべての Well から上清を注意深く除去する。(または、強くフリックすることにより上清を除去する。溶液がなるべく残らないようにする。) 上清を除いたペレットをほぐすためにボルテックスをかける(ドライボルテックス)。
4. 各 Well に Wash Buffer 80 μ L を加える。LABScanTM 100 で蛍光強度を読み取るために、8 連あるいは 12 連のピペットで各 Well 中の混合液をよく攪拌し、すべて 96 Well micro plate (250 μ L) に移す。
5. LABScanTM 100 にかけるまでは、microplate は遮光して 2-5 $^{\circ}$ C に置く事(約 4 時間まで保存可能だが、最適な結果を得るためにはなるべく早く蛍光強度を読むこと)。
6. アッセイ用のトレーに対応させて、Sample ID を記録しておく事。
7. LABScanTM 100 における microplate の各 Well の蛍光読み取り順序は以下の通り。

LABScanTM 100(2.2 又は 2.3)では A1 \rightarrow H1、続いて A2 \rightarrow H2、A3 \rightarrow H3 ... A12 \rightarrow H12 の順で蛍光強度を読み取って行く。



予想される読み取り値 :

陽性コントロールの MFI (Median Fluorescence intensity) は 1000~5000MFI。

各プローブは陽性コントロールに対する%として表される。

各プローブのカットオフ値は 100~200 個の DNA サンプルを用いて設定済。

1.4 アッセイ方法:チューブ法

1.4.1 Denaturation/Neutralization ステップ:

1. クラシユアイスを準備する。
2. ラックに Sample ID を記入したきれいな 1.5 mL のチューブを置く。
3. 増幅した DNA を 5 μ L ずつ対応する Sample ID を記入したチューブに加える。
4. P-10 ピペット等で Denaturation Buffer を各チューブに 2.5 μ L ずつ加える。数回ピペッティングして混合する。チューブのキャップをして、室温(20-25 $^{\circ}$ C)で 10 分間インキュベートする。
5. Neutralization Buffer を 5 μ L ずつ加え 10 秒間 Vortex をかける。(色がピンクから無色(やや黄色)に変化するのを確認)。
6. クラシユアイスの上にチューブを立てる。

1.4.2 Hybridization ステップ:

1. サーマルサイクラーのスイッチが入って、60 $^{\circ}$ C のプログラムでサーマルサイクラーのブロック
2. ヒーティング開始したかどうか確認する。
3. Bead Mixture と Hybridization Buffer を混和して Hybridization Bead Mix を準備する。Denature した DNA の入った各チューブに **Hybridization Bead Mix** を 38 μ L ずつ加える。
4. チューブのキャップをして低速で数秒 Vortex をかける。飛び散らないように注意。
5. あらかじめ暖めておいたサーマルサイクラーに移し、60 $^{\circ}$ C で 15 分間、遮光してインキュベートする。
6. 15 分間のインキュベーション中、1 x SAPE 溶液を調製し遮光して置く。
7. 15 分間のインキュベーションの後、各チューブに Wash Buffer を 100 μ L ずつ加える。
8. 各チューブを 14,000 rpm で 2 分間遠心する。
9. P-200 ピペット等を用い、上清を注意深く除去する。この時上清は全て除去せず、約 30 μ L 程度チューブに残すようにする(ピペットチップの先を 50 μ L のラインの所に合わせて、ゆっくり上清を除去するよ良い)。チューブの底のビーズのペレットを崩さないよう注意する。上清を除いたペレットをほぐすためにボルテックスをかける(ドライボルテックス)。
10. 上記洗いのステップ(6-8)をさらに 1 回繰り返す。

1.4.3 Labeling ステップ:

1. 各チューブ約 30 μ L の混合液が残った各チューブに、1 x SAPE 溶液を 50 μ L ずつ加え、蓋をして Vortex をかける。
2. 60 $^{\circ}$ C に暖めてあるサーマルサイクラーに移し、60 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートする。
3. 各チューブに Wash Buffer を 100 μ L ずつ加える。
4. チューブを 14,000 rpm で 2 分間遠心する。
5. P-200 等を用い、上清を注意深く除去する。この時上清は全て除去せず、約 30 μ L 程度チューブに残すようにする。(ピペットチップの先を 50 μ L のラインの所に合わせて、ゆっくり上清を除去すると良い。)
6. 各チューブに Wash Buffer を 70 μ L 加える。全てのチューブにほぼ 80 μ L の反応溶液が入っている事を確認する。
7. 全てのチューブを遮光して置く。
8. 直ちに測定しない場合は遮光して 2-5 $^{\circ}$ C に置く事。30 分以内に測定する。

注意事項：

- ビーズの非特異吸着を最小限にとどめる為、推奨するチューブ、トレー、チップ類を利用する事。
- ビーズは必ず、ピペットを使用し均一に懸濁させた状態で分注する事。
- ビーズは遮光して保存する。作業中も極力、光を当てないようにアルミホイルを掛ける等、注意する事。
- 一度解凍したビーズは2-5℃で保存し、3ヶ月以内に利用する事。再凍結してはいけない。
- 長期保存には-20℃で冷凍する事。
- 必要な全ての試薬を至適温度、状態に置く事

96 well プレート法の注意事項：

- 96 well プレート法での混合はトレーをシールして、低速で Vortex をかけるので、Vortex をかけた時に、Well 内の溶液が飛び散らないで適度に混合するよう、スピード調整して、その値を記載しておく事。
- シールで蓋する時は、Well 間のコンタミを防ぐため Well の縁にしっかり押し付けて確実にシールする事。

株式会社ベリタス 〒105-0001 東京都港区浜松町 1-10-14 住友東新橋ビル3号館5階

技術的なお問い合わせは: TEL 03-5776-0040 E-mail techservice@veritastk.co.jp