

MLPA法の全般的なプロトコル

必要な構成要素

名称	品番	成分
SALSA® MLPA® Probemix	プローブミックス 製品説明書を参照	合成オリゴヌクレオチド、 非病原性細菌株を用いて合 成されたオリゴヌクレオチ ド、Tris-HCl、EDTA



以下の製品と併用します:

- [SALSA® MLPA® Reagent Kit](#) (品番: EK1-FAM、EK1-CY5、EK5-FAM、EK5-CY5、EK20-FAM)
- [データ解析ソフト Coffalyser.Net™](#) (品番: 該当なし)

一部のアプリケーションでは、以下の製品と併用可能です:

名称	品番	成分
SALSA® Binning/Reference Selection/Artificial Duplication DNA	SDXXX	Tris-HCl、EDTA、合成/コン トロールプラスミドDNA、 ヒトゲノム女性DNA、 細胞株DNA

製品の保存方法と保存可能期間

推奨条件		
------	---	---

推奨の保管条件で元の包装のまま保管した場合、製品の品質は有効期限まで保証されます。正確な有効期限は、バイアルのラベルをご確認ください。製品の凍結融解は、25回以上繰り返さないでください。到着時に包装が破損している場合や開封されている場合は、製品を使用しないでください。製品は元の容器に入れたまま保管してください。廃棄する場合は、国および地域の規制に従って処分してください。

製品の安全性

本製品に含まれる成分は、ヒト、動物、病原性細菌、病原性ウイルス由来ではありません。含有濃度に基づくと、本製品の成分はいずれも危険有害性周知基準で定められた危険物に該当しません。そのため、本製品には[安全データシート \(SDS\) は不要です](#): いずれの試薬にも、SDS配布の対象となる濃度の危険物は含まれていません(規則 (EC) 第1272/2008号[EUGHS/CLP]、1907/2006号[REACH]、およびその改正に記載の通り)。漏洩が発生した場合は、水で洗浄し、施設内の適切な手順に従って処理してください。

測定原理 (MLPA)

SALSA® MLPA® は、特定のDNA配列を検出する最大60本のプローブの増幅に基づく半定量的手法です。本手法は、サンプルDNAの変性から始まり、次に、各プローブが2~3つのオリゴヌクレオチドからなるMLPAプローブの混合液を加えます。すべてのオリゴヌクレオチドがサンプルDNAとハイブリダイズした後、サンプルDNAに結合したプローブをライゲーション反応により結合させます。結合したすべてのプローブは、一方のプライマーが蛍光標識されたユニバーサルPCRプライマーペアを用いて増幅されます。これにより、各プローブで長さの異なる固有のPCR増幅産物のセットが得られます。増幅産物は、キャピラリー電気泳動装置で長さに応じて分離されます。得られたサンプル固有の電気泳動図は、Coffalyser.Netで解析します。最終的に、電気泳動図をサンプルとリファレンスサンプル集団で比較することで、対象サンプル中に存在する標的ゲノム配列の数を推定できます。

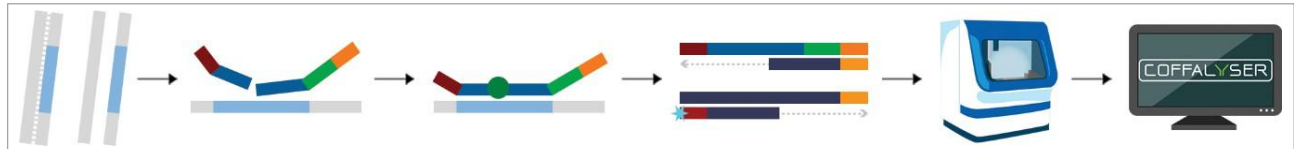


図1. MLPAワークフロー

必要な材料（別途ご準備ください。）

- 超純水
- TE_{0.1} (10 mM Tris-HCl pH 8.0+ 0.1 mM EDTA)
- ヒートリッド (99-105°C) 付きキャリブレーション済みサーモサイクラーおよび標準的な実験機器
- 0.2 ml PCRチューブ/ストリッププレート
- フラグメント解析ソフトを搭載し、変性条件下で動作するキャピラリー電気泳動装置；詳細な情報は[ヘルプセンターの記事](#)をご覧ください
- 高品質なホルムアミド
- 標識されたサイズスタンダード：Applied Biosystems GeneScan™ 500 LIZ® /ROX™；SCIEX CEQ™ DNA Size Standard kit - 600
- ゲルポリマー：POP-1、POP-4、POP-7 (Applied Biosystems)；GenomeLab™ Linear Polyacrylamide denaturing gel (SCIEX)；Spectrum Compact Polymer4 (Promega)；Hitachi DS3000 Polymer4 (Hitachi)

サンプル要件

50~250 ngのヒトDNA（特記事項がない場合）を、プローブミックスの製品説明書に記載された組織から抽出してください。DNAサンプルは、pH 8.0~8.5の5~10 mM Tris-HCl bufferに溶解する必要があります。

推奨抽出方法：

- QIAGEN Autopure LS（自動）および QIAamp DNA mini/midi/maxi kit（手動）
- Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit（手動）
- 塩析法（手動）

注意事項および警告

一般的な注意事項

1. 製品が破損している場合、有効期限を過ぎている場合は使用しないでください。
2. 専門の用途に限りです。本アッセイは、分子生物学的手法に精通した専門スタッフが実施してください。
3. 各アッセイの内部バリデーションは必須です。特に、初めて使用する場合、検体処理手順やDNA抽出法、使用機器を変更する場合に必要です。健常者から採取した16種類以上の異なるDNAサンプルを使用してください。バリデーションにおいては、各プローブの標準偏差が0.10以下に収まる必要があります（プローブミックスの製品説明書に別途記載がある場合を除く）。
4. 結果の解釈を担当する者は、アプリケーションに関する最新の科学的知見、およびMLPA法の限界により誤った結果となる可能性を認識する必要があります。
5. データ解析にはCoffalyser.Netを使用してください。他のソフトを使用すると誤った結果となる可能性があります。
6. 結果の解釈を行う前に、必ず品質管理スコアを確認してください。品質スコアが良好な場合のみ、サンプル結果について信頼性の高い結果解釈が可能です。
7. 明らかなホモ接合性欠失が認められた場合は、ピン設定の問題やシグナル低下による誤った結果を除外するため、電気泳動図を目視で確認してください。
8. MLPAの結果は、他の臨床的・診断的所見と併せて、専門的な実務基準に従ってご使用ください。これには、代替法による確認、両親の遺伝情報の評価、臨床遺伝学的評価やカウンセリングなどが含まれます。検査結果は、臨床分子遺伝学者やそれに準ずる方が解釈してください。

検体品質の注意事項

9. DNAサンプル溶液の緩衝能が不十分な場合、DNAの脱プリン化が発生し、誤った結果が生じる可能性があります。緩衝能が十分かどうか不明な場合は、以下のTris-HCl緩衝液を加えてください：4 µlのサンプルDNA + 1 µlの50 mM Tris-HCl (pH 8.5)。
10. DNA抽出後に残存する不純物（塩、ヘパリン、EDTA (>1.5 mM)、鉄）は、アッセイの性能に影響を与える可能性があります。
11. DNAサンプル中の塩は、変性不足を引き起こす可能性があります。これにより、隣接するゲノム標的配列を認識する複数のプローブがあっても、見かけ上は明らかな欠失となることがあります。QIAGEN M6、M48、およびM96システムは使用しないでください。これらのシステムは塩が過剰に残ります。QIAGEN EZ1を使用する場合は、MLPA用の[QIAGEN 補足プロトコル](#)に従ってください。
12. DNA溶液は蒸発やSpeedVacで濃縮しないでください。EDTAや塩濃度が高くなります。

実験時の注意事項

13. 1反応あたり5µlを超えるDNA溶液を使用しないでください。必要なDNA量は、プローブミックスの製品説明書に記載されています。
14. 異なるロットのMLPAプローブミックスを混合しないでください。
15. 一晚のハイブリダイゼーションや、ライゲーションマスターミックスをピペティングする際の蒸発により、夾雑物や塩濃度が上昇する可能性があります。蒸発防止/軽減のため以下の対応をお願いします。
 - a. マルチチャンネルピペットを使用し、操作時間を短縮する
 - b. ヒートリッドが正常に機能していることを確認する
 - c. ヒートリッドの圧力を調整する
 - d. 異なる種類の反応チューブを使用する
 - e. DNAサンプル溶液の液面を覆うように、ミネラルオイルを少量滴下する。
16. キャピラリーやポリマーを定期的に交換してください。ポリマーは、25°Cを超える環境に長時間さらされると急速に劣化します。サイズスタンダードのピークが低く広がる現象が継続する場合は、キャピラリーやポリマーの劣化が原因である可能性があります。
17. ホルムアミドは加熱により酸化し、PCR産物の脱プリン化や断片化を引き起こす可能性があります。高品質なホルムアミドを使用し、-20°Cで小分けにして保存してください。
18. PCR産物の量は、全注入混合液の10%を超えないようにしてください。ピークが低い場合は、注入時間や電圧を増加させ、PCR産物は追加しないでください。
19. 1つ以上のピークが検出範囲を振り切っている場合、誤った結果につながる可能性があります。プローブの本数が比較的少ないプローブミックスを使用する場合にそのリスクが高まります。シグナルを下げるためには、以下の条件を変更した上でPCR産物を再泳動します。：
 - a. 注入電圧を低くする / 注入時間を短くする；
 - b. PCR産物の量を減らす。
20. DNAサンプルにcDNAや個々のエクソン由来のPCR増幅産物が混入すると、プローブシグナル値が増大する可能性があります。別途採取・抽出したDNAサンプルを独立的に解析することで、これらのアーチファクトを除外できます。

アプリケーション固有の注意事項

プローブミックスの製品説明書を参照してください。

実験手順 第1部 – MLPA反応

手順	サーモサイクラープログラム
1. DNA変性	
1.1 0.2 mlのチューブ/ストリッププレートをラベルします。 1.2 各チューブにDNAサンプルまたはTE (no-DNAコントロールの場合) を5 µl加えます。 1.3 チューブをサーモサイクラーにセットし、98°Cで5分間加熱した後、25°Cまで冷却します。	98°Cで5分間 25°Cで一時的停止
2. ハイブリダイゼーション	
2.1 MLPA BufferとMLPA Probemixを解凍し、ボルテックスした後、短時間で遠心処理します。室温に戻した後、ピペティングします。 2.2 ハイブリダイゼーションマスターミックス を調製します。1反応あたり*: ● MLPA Buffer: 1.5 µl ● MLPA Probemix: 1.5 µl ボルテックスまたはピペティングでよく混合します。 2.3 各チューブに ハイブリダイゼーションマスターミックス を3 µl加えます。このステップでは正確なピペティングが必須です! ピペティングで混合します。 2.4 チューブをサーモサイクラーにセットし、95°Cで1分間インキュベートした後、60°Cで16~20時間ハイブリダイゼーションを行います。	95°Cで1分間 60°Cで一時的停止 (16~20時間)
3. ライゲーション	
3.1 Ligase Buffer AとLigase Buffer Bを解凍し、ボルテックスした後、短時間で遠心処理します。室温に戻した後、ピペティングします。Ligase-65を手で10秒ほど温めます。ボルテックスは行わず、短時間で遠心処理します。 3.2 LIGASE-65 マスターミックス** を調製します。1反応あたり*: ● 超純水: 25 µl ● Ligase Buffer A: 3 µl ● Ligase Buffer B: 3 µl ● Ligase-65: 1 µl (最後に添加) ピペティングで上下に穏やかに混合します。ボルテックスは行わないでください。 3.3 サーモサイクラーのプログラムを継続し、チューブを54°Cまで冷却します。 3.4 54°Cで サーモサイクラー内の反応チューブ を開け、各チューブに LIGASE-65 マスターミックス を32 µlずつ加え、ピペティングでよく混合し、その後チューブを閉じ、54°Cで15分間インキュベートします。 3.5 98°Cまで加熱し、5分間インキュベートしてリガーゼを不活化します。その後、20°Cまで冷却します。***	54°Cで一時的停止 54°Cで15分間 98°Cで5分間 20°Cで一時的停止
4. PCR	
4.1 PCR Primer Mixを解凍し、ボルテックスした後、短時間で遠心処理します。ポリメラーゼを手で10秒ほど温めます。ボルテックスは行わず、短時間で遠心分離します。 4.2 ポリメラーゼマスターミックス を調製します。1反応あたり*: ● 超純水: 7.5 µl ● PCR Primer Mix: 2 µl ● Polymerase: 0.5 µl ピペティングで上下に穏やかに混合します。ボルテックスは行わないでください。 4.3 20°Cで各チューブに ポリメラーゼマスターミックス を10 µlずつ加え、ピペティングでよく混合し、速やかにPCRプログラムを実行します。 4.4 PCR終了後は夾雑物の混入を防ぐため、同じ部屋でチューブを開けないでください。PCR産物を取り扱う際には、別のマイクロピペットを使用します。 4.5 PCR産物は遮光して保存します。1週間以内であれば4°Cで保存可能です。長期間保存する場合は、-25°Cから-15°Cで保存します。	35回のPCRサイクル: ● 95°Cで30秒 ● 60°Cで30秒 ● 72°Cで60秒 72°Cで20分 15°Cで一時的停止

*サンプル量のばらつきを最小限に抑えるため、マスターミックス溶液は十分量 (5~10%の余裕を持たせる) で調製します。
 **事前に調製する場合 (使用する1時間前)、マスターミックスは氷上または4°Cで保存し、チューブに加える前に室温に戻します。
 ***PCRを行うためにチューブを別のラボに持ち込む際は、PCR用のサーモサイクラーを予熱してください。例えば、95°Cで1秒間加熱した後、20°Cで一時的停止します。
 また、チューブの移動時間を最小限に抑えます (例えば5分以内)。チューブをサーモサイクラーにセットし、ステップ4.1を続行します。これにより、非特異的なピークの出現を最小限に抑えることができます。

実験手順 第2部 - フラグメント分離

1. Coffalyser.Netが対応している一般的なキャピラリー電気泳動装置の注入条件	
PCRプライマーの蛍光標識：FAM	
ABI SeqStudio	キャピラリー長: 28 cm 注入混合液: <ul style="list-style-type: none"> PCR産物 0.8 µl GS500サイズスタンダード 0.3 µl (ROX/LIZ) HiDi ホルムアミド 12 µl 注入プレートを密封し、86°Cで3分間加熱した後、4°Cで2分間冷却する。
ABI Prism 3100 ABI 3130 (xL) ABI 3500 (xL) ABI 3730 (xL) ABI SeqStudio Flex RUO/Dx	キャピラリー長：36 cmまたは50 cm 注入混合液： <ul style="list-style-type: none"> PCR産物 0.7 µl GS500 サイズスタンダード 0.3 µl (ROX) または 0.2 µl (LIZ) HiDi ホルムアミド 9 µl 注入プレートを密封し、86°Cで3分間加熱した後、4°Cで2分間冷却する。
Hitachi DS3000*	
Promega Spectrum Compact*	*36 cmのキャピラリーのみの対応です。
PCRプライマーの蛍光標識：Cy5	
SCIEX CEQ 2000 SCIEX CEQ 8000 SCIEX CEQ 8800 SCIEX GenomeLab GeXP	キャピラリー長: 33 cm 注入混合液: <ul style="list-style-type: none"> PCR産物 1 µl SS600 サイズスタンダード 0.5 µl HiDi ホルムアミド / Beckman SLS 28.5 µl 高品質なミネラルオイルを1滴加える。
2. 電気泳動の設定	
アプリケーション、機器、ポリマー、キャピラリー長に適したフラグメント解析のデフォルトの設定を使用してください。シグナル値が最適な検出範囲内に収まり、すべてのフラグメントを検出できる泳動時間となるように、機器設定の調整が必要になる場合があります。最適シグナル範囲 (RFU単位) および各機器の最小/最大シグナル強度は、 Coffalyser.Net リファレンスマニュアル に記載がございます。	

結果の解釈と確認 & 性能特性

各アプリケーションにより異なりますので、各プローブミックスの製品説明書をご参照ください。

MLPA法の限界

- 多くの集団やほとんどのMLPAの用途において、遺伝子異常の主な原因は小さな(点)変異であり、その多くはMLPAでは検出されません。
- MLPAは、逆位や均衡型転座、あるいはMLPAプローブの検出配列外に(一部が)存在するコピー数変化のほとんどを検出できません。
- DNAサンプル中の不純物、DNAの不完全な変性(例: 塩による影響)、サンプルDNA量の不足または過剰、リファレンスサンプルの数が不足または選択が不適切、キャピラリー電気泳動の問題、データ正規化手順の不備、その他の技術的エラーにより、解析性能が低下する可能性があります。
- 実験条件のわずかな違いが、MLPAピークパターンに影響を与える場合があります。解析には、a) 同じMLPA実験に含まれ、b) 同一のプローブミックスのロットで測定されたサンプルのみを含めるようにしてください。
- 正確な結果解釈のために、場合によっては親サンプルの解析が必要となることがあります。
- 特定のコピー数異常は、染色体全体の大きな欠失や重複を含む体細胞変異に起因する可能性があります。
- プローブが標的とする配列の小さな変化(例: SNVや小さな indel)によって、偽陽性の結果が生じる場合があります。これは、プローブのライゲーション部位から20塩基以上離れた位置でも起こり得ます。配列の変化は、プローブオリゴヌクレオチドのライゲーションの阻害や、サンプルDNAへのプローブの結合を不安定にすることで、プローブシグナルを低下させることがあります。MLPAで検出された異常値は必ず確認する必要があります。特に、単一のプローブで異常が検出された場合は、必ず確認を行ってください。その際、標的領域の配列をシーケンス解析することが推奨されます。
- 全ゲノム増幅反応で得られたDNAは、増幅バイアスによりMLPAには適していません。
- MLPAは、細胞から抽出したDNAサンプルの標的ゲノム配列の平均コピー数を測定します。隣接する配列を標的とする複数のプローブが異常な値を示しても、欠失/重複の通常閾値に達しない場合は、モザイクが原因の可能性があります。モザイク症例で観察されるような微小な変化は、プローブを染色体位置順に並べた場合にのみ識別できる場合があります。
- MLPAで検出されたすべてのコピー数変化が病理性であるわけではありません。MRC Hollandは、特定の欠失または重複が疾患を引き起こすかどうかに関する情報を提供できません。

品質管理とデータ解析



品質管理とデータ解析には、Coffalyser.Net™ の最新バージョン ([MRC Holland ウェブサイト](#)からダウンロード可能) を使用してください。

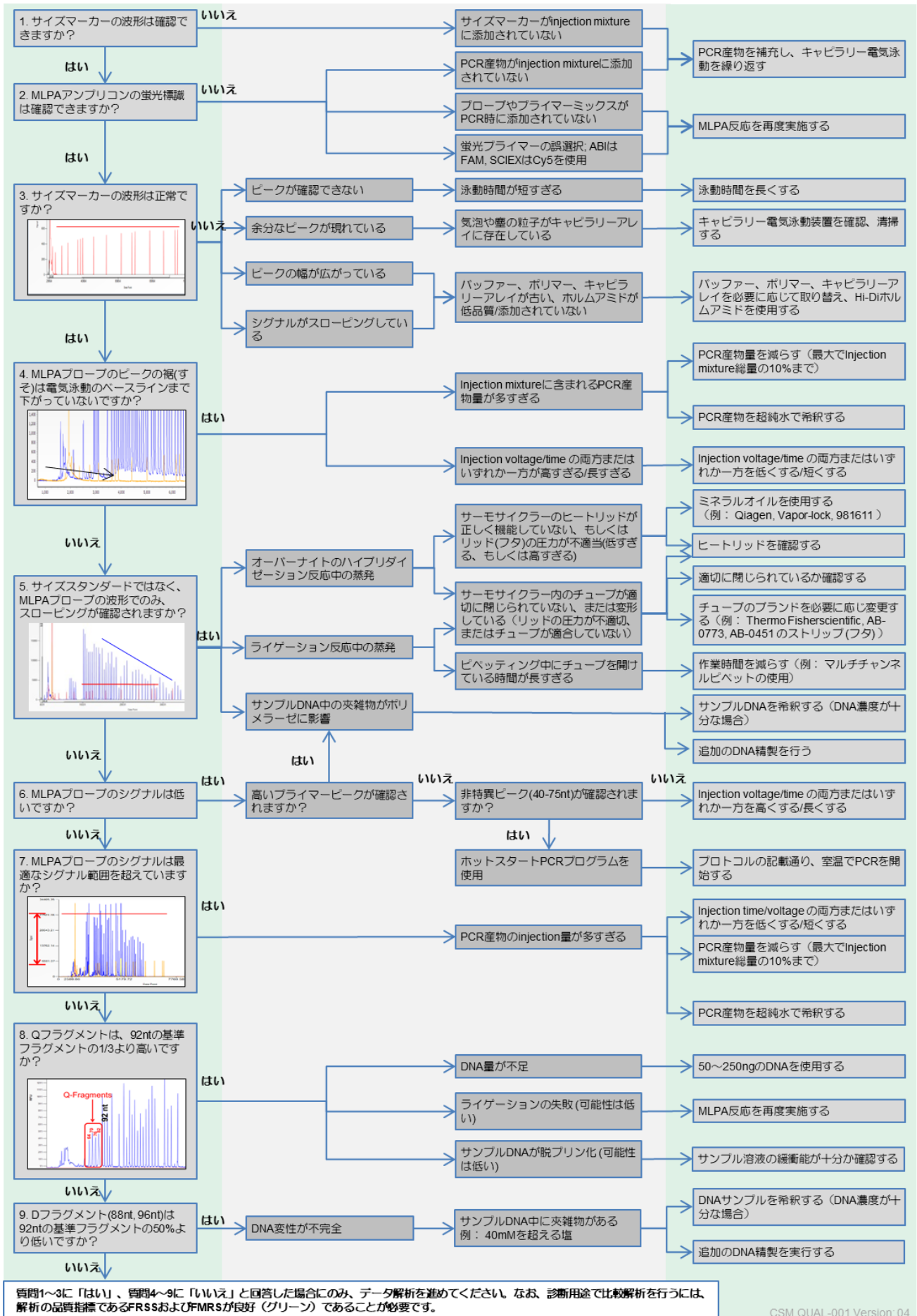
詳細な操作手順については、[Coffalyser.Net リファレンスマニュアル](#)をご参照ください。

ヘルプセンター内の以下の記事もご参照ください：

- [Quantity および Denaturation コントロールフラグメントの説明](#)
- [no-DNA コントロールに関する情報](#)

トラブルシューティングに関する更なるサポートについては、[MRC Holland ヘルプセンター](#)のトラブルシューティングページをご覧ください。


トラブルシューティングのフローチャート



追加情報

オンライン説明ビデオ [MLPAの原理](#)。

Schouten JP et al. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 30:e57.

<p>詳細 www.mrcholland.com; support.mrcholland.com</p>	
	<p>MRC Holland BV; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amsterdam, the Netherlands</p>
メール	<p>info@mrcholland.com (情報および技術的なお問い合わせ); order@mrcholland.com (注文)</p>
電話	+31 888 657 200

MRC Holland, SALSA, MLPA, digitalMLPA, Coffalyser.Net, Coffalyser digitalMLPAおよびそれらのロゴは、MRC Holland BVの商標または登録商標です。本書に記載されたその他のブランドおよび名称は、それぞれ該当する所有者に帰属します。



プロトコルの変更内容
<p>バージョン 010-JA1 - 2025年5月21日</p> <ul style="list-style-type: none"> - ページ 4 で、ABI SeqStudio Flex はABI SeqStudio Flex RUO/Dx に名称が変更されました。 <p>バージョン 009 - 2024年5月21日</p> <ul style="list-style-type: none"> - プロトコル構成とデザインを変更しました。 - SALSA MLPA アッセイの各構成要素の詳細情報について、マニュアル内の表ではなく、各製品の説明書を参照する形式に変更しました。 - 標準のパッケージラベルに関するセクションを削除しました。 - MLPAの原理に関するセクションを修正し、ワークフローの図を改良しました。計算に関する図を削除しました。 - 「必要な材料（別途ご準備ください）」セクションを更新しました。 - 「サンプル処理および保管」に関する情報を整理し、セクションを短縮して「サンプル要件」に改名しました。一部の情報を「注意事項および警告」に移動しました。 - 「リファレンスサンプルおよびその他コントロールサンプルの選択」セクションは、製品説明書に同じ内容が含まれているため削除しました。 - 第3章「開始前に読むべき注意事項」の情報は、実験手順パートIIに移動しました。 - 第5章と第6章（MLPAプロトコルの概要・詳細）の情報は、新しい表形式で実験手順パートIに統合しました。 - 変性後にサーモサイクラーからチューブを取り出し、ハイブリダイゼーションマスターミックスを加えた後に戻す、という手順を削除しました。 - ポリメラーゼマスターミックスを加える前にチューブをサーモサイクラーにセットする手順を削除しました（事前にチューブを取り外す指示が無かったため）。 - 実験手順パートIIに脚注を追加し、チューブを別のラボに持ち込みPCRを行う場合の手順を記載しました。 - セクション7.1の「開始前に読むべき注意事項」の情報は、「注意事項および警告」に移動しました。 - セクション7.2の「キャピラリー電気泳動装置のシグナル範囲に関する表」は、Coffalyser.Netリファレンスマニュアルの対応する表を参照する形式に変更しました。 - 第8章（品質管理とトラブルシューティング）の情報を削除し、「Coffalyser.Net リファレンスマニュアル」および「コントロールフラグメントとno-DNAコントロールに関する解説記事」を参照する形式に変更しました。 - 第9章（データ解析）を削除し、「Coffalyser.Net をダウンロードし、Coffalyser.Net リファレンスマニュアルを参照する」という指示に変更しました。 - 第10章（解釈と確認）の情報は「注意事項および警告」または「MLPA法の限界」に移動、あるいは特定の用途に限られた内容であるため削除しました。